

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

INDUCTION DE L'AUTOPHAGIE ET DE L'APOPTOSE PAR LE PEROXYDE
D'HYDROGÈNE : IMPLICATION DE LA THERMOTOLÉRANCE (40°C)

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
MAUREEN VERONIQUE DUTORDOIR

AVRIL 2016

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.07-2011). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

DÉDICACE

À mon cher et tendre époux

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout d'abord ma directrice de recherche, la professeure Dr Diana Averill, pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'accueillant au sein de son laboratoire durant ces deux années. Merci pour le soutien qu'elle m'a apporté dans la gestion de mon projet de recherche, ainsi que pour sa gentillesse et sa compréhension qui m'ont aidé à affronter les difficultés que j'ai rencontré durant mon parcours.

Je remercie également messieurs Benoit Barbeau et William Willmore, d'avoir accepté de prendre de leur précieux temps pour évaluer ce mémoire. Leurs critiques permettront assurément d'améliorer la qualité de ce travail.

Un immense merci à mes camarades de laboratoire. Merci tout d'abord à Audrey Glory, qui m'aura supporté durant l'intégralité de ma maîtrise, et qui a toujours été là pour m'aider aussi bien sur le plan expérimental que théorique. Félicitations pour son doctorat et pour la terreur qu'elle a su nous inspirer. Merci également à Mélanie Chow-Shi-Yée pour sa bonne humeur communicative, son dynamisme et son soutien psychologique, il en faut! Merci à Sarah Kassis pour son immense gentillesse et ses sympathiques remarques bien senties, merci à Marcelline Tchouagué pour sa sérénité et pour le fond sonore exotique permanent, merci à Bélinda Crobeddu pour son grain de folie (en particulier ménager!). Merci également à notre collègue d'adoption, Clara Lafortune, pour son enthousiasme débordant et ses licornes. Elles ont rendu ces deux années inoubliables, ont supporté mes interludes musicaux et ont largement contribué à mon engraissement, pour mon plus grand plaisir!

Je remercie la docteure Mélanie Grondin, pour son aide technique et ses nombreux conseils. Un très grand merci également à Olivier Mornet, qui m'a très gentiment et patiemment aidé pour la réalisation des plus belles figures de l'introduction de ce mémoire.

Merci enfin à Elvis Redza, de m'avoir accompagnée, encore une fois tout au long de cette aventure.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
RÉSUMÉ	XI
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1 Le stress oxydatif.....	2
1.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène et leur fonction cellulaire.....	2
1.1.2 Les systèmes de défense antioxydants	4
1.1.3 Le stress oxydatif et ses effets néfastes	5
1.2 Forte dose de stress et induction de la mort cellulaire.....	7
1.2.1 Présentation de l'apoptose.....	7
1.2.1.1 Description générale	7
1.2.1.2 Principaux mécanismes de régulation.....	8
1.2.1.2.a Voie mitochondriale (intrinsèque)	9
1.2.1.2.b Voie des récepteurs de mort (extrinsèque).....	12
1.2.1.2.c Voie du réticulum endoplasmique (extrinsèque)	16
1.2.1.3 Apoptose et stress oxydatif	19
1.2.2 Présentation de la nécrose	22
1.3 Faible dose de stress et induction des systèmes de défense adaptatifs : thermotolérance (40°C)	23
1.3.1 Réponse adaptatrice de thermotolérance (40°C).....	24
1.3.2 Systèmes de défense induits par la thermotolérance	25
1.3.2.1 Protéines de choc thermique	25
1.3.2.2 Système de défense antioxydant	26
1.3.2.3 Systèmes de défense du réticulum endoplasmique	26

1.3.2.4	Systèmes de défense anti-apoptotique	30
1.4	Autophagie.....	30
1.4.1	Description générale.....	30
1.4.2	Principaux mécanismes de régulation	32
1.4.3	Autophagie et stress oxydatif.....	37
1.4.4	Implication de l'autophagie dans la survie ou la mort cellulaire	38
1.5	Présentation du projet.....	40
1.5.1	Introduction	40
1.5.2	Hypothèses	41
1.5.3	Objectifs du projet.....	42
1.5.4	Choix du modèle	42
CHAPITRE II		
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX		44
2.1	Préface	44
2.2	Article	45
2.2.1	Abstract	47
2.2.2	Résumé	48
2.2.3	Introduction	49
2.2.4	Materials and Methods	52
2.2.5	Results	55
2.2.6	Discussion	62
2.2.7	Conclusion.....	67
CHAPITRE III		
CONCLUSION		80
RÉFÉRENCES.....		86

LISTE DES FIGURES

Fig. 1.1 : Espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydants.....	4
Fig. 1.2 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose	8
Fig. 1.4 : Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort	15
Fig. 1.5 : Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie du réticulum endoplasmique	17
Fig. 1.8 : Voies de signalisation impliquées dans l' « Unfolded Protein Response ».	29
Fig. 1.9 : Principales étapes de l'autophagie (macroautophagie).....	31
Fig. 1.10 : Régulation de l'autophagie par l'intermédiaire de mTOR.	33
Fig. 1.11 : Régulation de l'autophagie par l'intermédiaire de la voie PI3K III/mTOR	35
Fig. 1.12 : Régulation de l'autophagie par l'intermédiaire des complexes Atg5-Atg12- Atg16L et LC3-PE.	36

ARTICLE

Fig. 2.1 : Low dose oxidative stress transiently activates autophagy	69
70	
Fig. 2.2 : Low dose oxidative stress enhances Beclin-1 expression in thermotolerant cells	70
Fig. 2.3 : Low dose oxidative stress enhances LC3 expression in thermotolerant cells.	71
Fig. 2.5 : Inhibition of autophagy increases H ₂ O ₂ -mediated chromatin condensation and caspase-3 activation: protection against apoptosis in mildly thermotolerant cells.....	73
Fig. 2.6 : Inhibition of autophagy increases H ₂ O ₂ -mediated caspase-9 and -8 activation: protection by mild thermotolerance against mitochondria and death receptor-mediated apoptosis.....	74
Fig. 2.7 : Inhibition of autophagy increases H ₂ O ₂ -mediated calpain and caspase-4 activation: mild thermotolerance protects cells against ER-mediated apoptosis.	75
Fig. 2.8 : Inhibition of autophagy increases H ₂ O ₂ -mediated caspase-7 activation: mild thermotolerance protects cells against ER-mediated apoptosis.....	76
Fig. 3.1 : Schéma bilan.....	85

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-MA	3-méthyladénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFC	7-amino-4-trifluoromethylcoumarine
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
AMBRA1	« Activating molecule in beclin-1 regulated autophagy »
AMC	7-amino-4-methylcoumarine
AMPK	AMP-Kinase
Apaf-1	Facteur activateur de l'apoptose 1
ASK-1	Kinase régulant le signal de l'apoptose
ATF4	Facteur de transcription activateur 4
ATF6	Facteur de transcription activateur 6
Atg	« Autophagy related genes »
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated
ATP	Adénosine tri-phosphate
Baf	Bafilomycine A1
Bcl-2	« B-cell-lymphoma protein 2 »
BH3	Domaine d'homologie aux protéines Bcl-2 3
BSA	Albumine sérique bovine
Ca²⁺	Calcium (II)
CAT	Catalase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHOP	Facteur de transcription protéique homologue à C/EBP
CO₂	Dioxyde de carbone
Cu/ZnSOD	Superoxyde dismutase à cuivre/zinc
Cyt c	Cytochrome c
DAMPs	Motifs moléculaires associés aux dégâts
DAPK-1	Protéine kinase associée à la mort
Daxx	Protéine associée à la mort 6
DD	Domaine de mort
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp
DISC	Complexe de signalisation induisant la mort
DMEM	« Dulbecco Modified Eagle's Medium »

DNP	2,4-dinitrophénol
DR	Récepteur de mort
DTT	Dithiothréitol
eIF2α	« Eukaryotic initiation factor 2 »
EDTA	« Ethylene diamine tetraacetic acid »
EGTA	« Ethylene glycol tetraacetic acid »
EITD	Glu-Ile-Thr-Asp
Endo G	Endonucléase G
ERN	Espèces réactives du nitrogène
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ERAD	Dégradation protéiques associée au réticulum endoplasmique
FADD	Domaine de mort associé au Fas
FBS	Sérum fœtal bovin
FasL	Ligand Fas
GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HO\cdot	Radical hydroxyle
HSF	Facteur de transcription de choc thermique
HSP	Protéine de choc thermique
IAP	Inhibiteur des protéines de l'apoptose
ICAD	Initiateur de l'ADNase activée par les caspases
Inh.	Inhibiteur
IRE-1α	Sérine/thréonine-protéine kinase/endoribonucléase dépendante de l'inositol
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LEHD	Leu-Glu-His-Asp
LEVH	Leu-Glu-Val
MCA	Méthoxycoumarine
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
MOPS	Acide 3-morpholinopropane-1 sulfonique
mTOR(C1)	Sérine/thréonine kinase cible de la rapamycine (complexe 1)
N	Cellules non thermotolérantes
NF-κB	Facteur nucléaire kappa-B
O₂	Dioxygène
O₂\cdot^-	Anion superoxyde
ONOO\cdot^-	Peroxynitrite
PARP	Poly-(ADP-ribose) polymérase

PBS	Tampon phosphate salin
PDI	Protéine disulfide isomérase
PE	Phosphatidyléthanolamine
PERK	« Protein kinase RNA-like ER kinase »
PIDD	Protéine inductible par p53 présentant un domaine de mort
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PIP2	Phosphatidylinositol-3,4-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PIPES	Acide 1,4-Piperazinediéthanesulfonique
PKB/C	Protéine kinase B/C
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
RAIDD	Protéine associée à RIP présentant un domaine de mort
RE	Réticulum endoplasmique
RIP	Protéines interagissant avec les récepteurs
RIPK	Kinases interagissant avec les récepteurs
SDS-PAGE	« Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis »
Smac/Diablo	« Second mitochondria-derived activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding protein with low pI »
SOD	Superoxyde dismutase
Suc-LY	Suc-Leu-Tyr
TNF	Facteur de nécrose tumoral
TRADD	Domaine de mort associé au TNF-R
TRAF-2	« TNF-associated factor-2 »
TRAIL	« TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand »
TSC 1/2	Facteur de sclérose tubéreuse 1/2
TT	Cellules thermotolérantes
UPR	« Unfolded Protein Response »
ULK	« Unc-51-like kinase 1 »
UVRAG	Gène associé à la résistance aux UV
XBP-1	« X-Box binding protein »

RÉSUMÉ

De nombreux composés environnementaux potentiellement toxiques génèrent des espèces réactives de l'oxygène, telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le stress oxydatif qui en résulte peut menacer l'homéostasie cellulaire. Or, d'une manière générale, de faibles doses de stress activent des systèmes de défense permettant la survie cellulaire, tandis qu'un stress plus intense active des voies de mort comme l'apoptose. Par ailleurs, un stress thermique faible ($40^{\circ}C$, 3h) induit une réponse adaptative de thermotolérance, qui confère une plus grande résistance aux cellules lors de leur exposition à un stress intense subséquent. Cet effet protecteur implique l'activation de protéines de choc thermique, antioxydantes, anti-apoptotiques et de défense du réticulum endoplasmique (RE). Le but du projet est de comprendre comment l'autophagie et l'apoptose sont régulés en réponse à différentes doses de H_2O_2 , et de déterminer si la thermotolérance ($40^{\circ}C$) peut protéger les cellules contre l'apoptose induite par le H_2O_2 en activant l'autophagie. Des cellules HeLa, thermotolérantes ou non, ont été traitées avec du H_2O_2 , puis des marqueurs de l'autophagie (expression de Beclin-1, de LC3 et activation des compartiments acides) ou de l'apoptose (activité des caspases et condensation de l'ADN) ont été mesurés. Les résultats ont montré que des marqueurs de l'autophagie étaient induits transitoirement, par des doses de H_2O_2 inférieures ($50\ \mu M$, 15-30 min) à celles activant l'apoptose ($50\ \mu M$, 3h). De plus, l'induction de la thermotolérance à $40^{\circ}C$ a augmenté le niveau d'activation de l'autophagie par de faibles doses de H_2O_2 ($50\ \mu M$, 15-30 min). Par ailleurs, un traitement avec des inhibiteurs de l'autophagie (bafilomycine A1 et 3-méthyladénine) a sensibilisé les cellules à l'apoptose induite par le H_2O_2 . Cette inhibition a augmenté le niveau d'induction des trois voies principales de l'apoptose : mitochondriale, des récepteurs de mort et du RE. L'autophagie est donc induite par de faibles doses de stress oxydatif et thermique et participe à la protection des cellules contre l'apoptose induite par de fortes doses de H_2O_2 . Compte tenu que de nombreux facteurs environnementaux génèrent du stress oxydatif, ces travaux améliorent notre compréhension des mécanismes impliqués dans leur toxicité. Ils permettront d'envisager des stratégies de protection envers les effets délétères des toxiques.

Mots clefs : Stress oxydatif, Thermotolérance, Hormèse, Autophagie, Caspases

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les organismes vivants, tissus et cellules sont en permanence exposés aux variations des paramètres de leur environnement tels que la température, le pH, la pression en oxygène, la concentration en métabolites, et la présence de signaux hormonaux ou immuns. Ils subissent également les agressions d'agents nocifs présents dans leur environnement tels que les radiations UV, les métaux lourds, les pesticides, les microparticules en suspension ou les dérivés chlorés. Ces facteurs peuvent être toxiques pour les cellules et tissus, leur causer des dégâts plus ou moins importants et aller jusqu'à causer leur mort.

L'exposition à de nombreux facteurs environnementaux a été mise en relation avec le développement de pathologies chez l'Homme. Ainsi, l'exposition à la pollution de l'air, à la fumée de cigarette ainsi qu'aux métaux lourds tels que l'arsenic et le cadmium, a été mise en relation avec le développement de maladies cardiovasculaires (Cosselman *et al.*, 2015). Un rapprochement a également été fait entre l'exposition aux polluants atmosphériques et le développement d'allergies respiratoires, de broncho-pneumopathie chronique obstructive ou encore de cancer du poumon (Marino *et al.*, 2015). Enfin, de plus en plus de facteurs environnementaux sont classés parmi les substances potentiellement carcinogènes (Hwang et Bowen, 2007; Joseph, 2009; Parron *et al.*, 2014; Schut et Snyderwine, 1999; Tabrez *et al.*, 2014; Taioli, 2008; Toyokuni, 2009). Cependant, les mécanismes moléculaires entrant en jeu dans les effets toxiques de nombreuses substances sont encore mal compris. L'amélioration de

la compréhension de ces mécanismes permettrait de mieux protéger les populations humaines contre les effets potentiellement néfastes des facteurs environnementaux, voire de traiter les pathologies induites par ces toxiques.

De nombreux facteurs potentiellement toxiques, tels que les UV, les radiations ionisantes, la fumée de cigarette, des toxines environnementales comme le paraquat, les métaux lourds et divers agents pharmaceutiques, génèrent des espèces pro-oxydantes, et notamment des espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Franco et Panayiotidis, 2009; Jaimes *et al.*, 2004; Leach *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009). Ces espèces chimiques, lorsque produites en excès, sont à l'origine du stress oxydatif qui conduit à l'endommagement des constituants cellulaires, voire à la mort des cellules. Ainsi, le stress oxydatif pourrait être impliqué dans les mécanismes de toxicité de nombreux facteurs toxiques environnementaux (Mena *et al.*, 2009). L'élucidation des mécanismes de toxicité de nombreuses substances nécessite donc de mieux comprendre les effets délétères générés par le stress oxydatif.

1.1 Le stress oxydatif

1.1.1 Les espèces réactives de l'oxygène et leur fonction cellulaire

Le dioxygène (O_2) joue un rôle très important dans la vie des organismes aérobies. En effet, il est l'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire de transport d'électrons permettant la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP. Cependant le métabolisme aérobie conduit à la formation de dérivés de l' O_2 , comme les ERO, dont les effets peuvent être néfastes (Pallepati et Averill-Bates, 2012).

Les ERO peuvent être des molécules neutres, telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), des ions, comme l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ou des radicaux, comme le radical hydroxyle (HO^{\cdot}). Elles sont très réactives et présentent des temps de demi-vie courts. Leurs propriétés leur permettent de moduler l'état oxydé ou réduit de nombreuses molécules, ce qui peut modifier leur fonctionnement, et rend les ERO essentielles pour le fonctionnement cellulaire. Ainsi les ERO interviennent notamment dans la transduction de signaux cellulaires, dans la croissance et la prolifération cellulaires, dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose, ainsi que dans des fonctions plus complexes telles que la régulation de la pression artérielle ou de la réaction immunitaire (D'Autreaux et Toledano, 2007; Dickinson et Chang, 2011; Valko *et al.*, 2007).

Les ERO peuvent être produites de manière exogène, par des facteurs environnementaux potentiellement toxiques, mais sont également formées de façon endogène, au sein des cellules (Bae *et al.*, 2011). Ainsi, dans les conditions physiologiques, l'une des principales sources d'ERO cellulaire est la chaîne respiratoire mitochondriale de transport d'électrons, qui génère du $\text{O}_2^{\cdot-}$ comme produit de la réduction incomplète du O_2 en eau (Murphy, 2009). De faibles niveaux de $\text{O}_2^{\cdot-}$ sont également produits lors des réactions catalysées par les NADPH oxydases présentes au niveau de la membrane plasmique cellulaire (Bedard et Krause, 2007), ainsi que par les peroxysomes et les cytochromes P450 (Bae *et al.*, 2011).

Au sein des cellules, le radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ a un temps de demi-vie très court et n'est pas capable de traverser les membranes; son effet est donc très local. Il peut également réagir avec des espèces réactives du nitrogène (ERN), conduisant à la formation de peroxynitrite (ONOO^{\cdot}) très réactif, ou être spontanément protonné, ce qui conduit à la formation de H_2O_2 . Cette dernière ERO a une plus grande demi-vie et est capable de diffuser à travers les membranes. Le H_2O_2 intervient dans des processus inflammatoires mais est aussi capable de réguler l'état oxydé ou réduit de nombreuses protéines par

l'oxydation de leurs résidus cystéine. Le H_2O_2 peut être converti en HO^\bullet suite à la réaction de Fenton impliquant des ions métalliques de transition Fe^{2+} ou Cu^{2+} . Le HO^\bullet est l'ERO la plus réactive et la plus potentiellement dangereuse pour les constituants cellulaires (Birben *et al.*, 2012; Valko *et al.*, 2007) (Fig. 1.1).

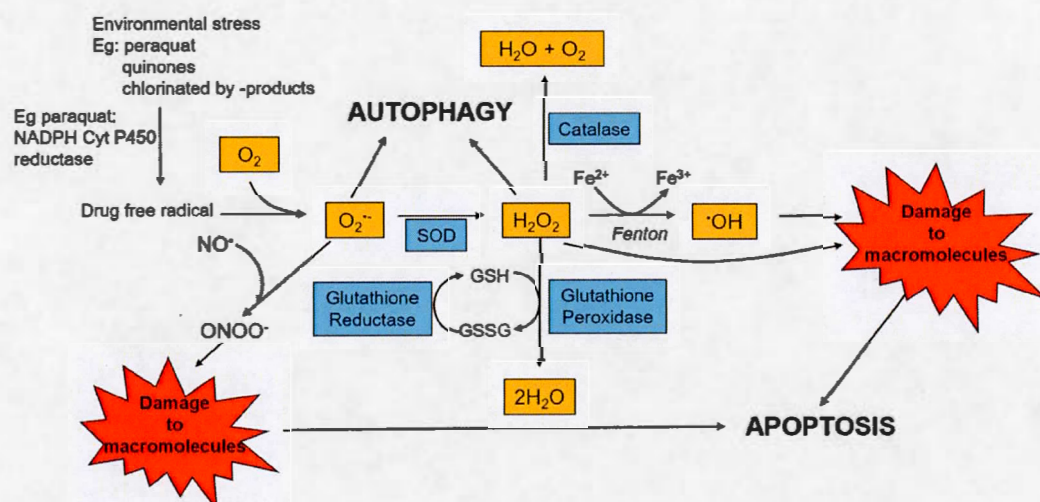


Fig. 1.1 : Espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydants

Le dioxygène (O_2) peut perdre un électron suite à sa réaction avec des radicaux libres et être converti en superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$). Cet anion peut être converti en peroxynitrite (ONOO^\bullet), par combinaison avec de l'oxyde nitrique (NO^\bullet), ou en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), par la superoxyde dismutase; ces deux réactifs peuvent attaquer les macromolécules biologiques. Le H_2O_2 peut être réduit par la catalase ou la glutathion peroxydase ou bien être converti en radical hydroxyle (OH^\bullet), au fort pouvoir oxydant, lors de la réaction de Fenton. Les ERO peuvent activer l'autophagie directement ou l'apoptose indirectement, par l'accumulation de dégâts oxydatifs.

1.1.2 Les systèmes de défense antioxydants

Bien qu'un faible niveau d'ERO soit essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire, ces espèces, lorsqu'elles sont présentes en excès, peuvent être potentiellement dangereuses pour l'organisme. L'évolution a permis aux êtres vivants de se doter de moyens de protection contre les dommages causés par les espèces pro-

oxydantes, en permettant leur conversion en espèce chimique non dangereuse et/ou en les neutralisant directement. Ce système de défense antioxydant présente une composante enzymatique et une composante non enzymatique (Birben *et al.*, 2012; Limon-Pacheco et Gonsebatt, 2009).

Parmi le système de défense enzymatique, la superoxyde dismutase (SOD), qu'elle soit cytoplasmique (Cu/ZnSOD), mitochondriale (MnSOD) ou extracellulaire, catalyse la dismutation du $O_2^{\cdot -}$ en O_2 et H_2O_2 . Afin d'éviter la réduction du peroxyde d'hydrogène en HO^{\cdot} lors de la réaction de Fenton, le H_2O_2 peut être dissocié en O_2 et H_2O par l'intermédiaire de la catalase (CAT) ou être réduit par la glutathion peroxydase (GPx). Cette dernière réaction est couplée à l'oxydation d'une molécule de glutathion (forme réduite GSH \rightarrow forme oxydée GSSG), tri peptide présentant une fonction thiol à l'origine de ses propriétés biochimiques. Le GSH est régénéré par la glutathion réductase, durant un processus faisant intervenir une molécule de NADPH (Fig. 1.1). D'autres enzymes telles que l'hème oxygénase, le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase et la peroxyrédoxine participent également à la protection contre les espèces pro-oxydantes (Pisoschi et Pop, 2015).

Le GSH appartient à la composante non enzymatique du système de défense antioxydant, de même que l'acide ascorbique (vitamine C), le α -tocophérol (vitamine E), le rétinol (vitamine A), les caroténoïdes, les flavonoïdes, les métalloprotéines ou la bilirubine. Ces molécules peuvent soit neutraliser directement les ERO, soit piéger des ions métalliques, défavorisant ainsi la réaction de Fenton, soit neutraliser les lipides peroxydés (Pisoschi et Pop, 2015).

1.1.3 Le stress oxydatif et ses effets néfastes

Le maintien de l'homéostasie redox cellulaire dépend de l'équilibre entre le niveau d'espèces pro-oxydantes et la capacité de prise en charge par le système de défense antioxydant. Le déséquilibre en faveur d'un excès d'espèces pro-oxydantes est

caractérisé en tant que stress oxydatif (Sies, 1997). Dans cette situation, les systèmes de défense antioxydants ne sont pas en mesure de contrer les attaques des espèces pro-oxydantes envers les constituants cellulaires. Ces espèces pro-oxydantes, et notamment les ERO, du fait de leur haute réactivité, sont capables d'oxyder l'ensemble des molécules biologiques, aussi bien l'ADN, que les lipides et les glucides, et ainsi endommager les cellules et tissus (Birben *et al.*, 2012; Deavall *et al.*, 2012) (Fig. 1.1).

L'oxydation de l'ADN peut conduire à l'apparition de mutations ayant des conséquences sur l'expression des gènes. Ces dommages au niveau du programme génétique peuvent causer des mutations, réversibles ou non, entraîner une dérégulation du cycle cellulaire conduisant à une prolifération cellulaire incontrôlée, ou contribuer à l'initiation de la carcinogénèse et à la progression tumorale (Hwang et Bowen, 2007; Kryston *et al.*, 2011). Du fait de l'absence de système de réparation de l'ADN au niveau mitochondrial, le matériel génétique mitochondrial est d'avantage sujet à l'accumulation de mutations dues au stress oxydatif que l'ADN nucléaire (Yakes et Van Houten, 1997).

Par ailleurs, l'oxydation des protéines peut avoir pour conséquence la modification de leur structure 3D et la perte de leur fonction (Davies, 2005). Lorsque les machineries de dégradation des protéines endommagées ne parviennent pas à les digérer, ces protéines s'accumulent dans le cytosol et s'agrègent, formant des complexes insolubles qui peuvent être toxiques pour les cellules, notamment les plus sensibles telles que les neurones (Uttara *et al.*, 2009).

Enfin, les ERO peuvent causer l'oxydation des groupements méthyles en bout de chaîne des acides gras polyinsaturés. Lorsque cette peroxydation atteint les lipides présents au niveau des membranes des cellules et organites, il s'ensuit une perte de la fluidité et de la perméabilité de ces barrières, pouvant altérer le fonctionnement cellulaire. De plus, la peroxydation des lipides conduit à la formation de produits pro-oxydants, telles que le 4-hydroxynonenal, considéré comme un second messenger du

stress oxydatif du fait de sa très haute réactivité. Sa capacité à oxyder des protéines ainsi que l'ADN renforcent la situation de stress oxydatif (Barrera, 2012).

D'une manière générale, le stress oxydatif a été mis en relation avec le développement de pathologies telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, et l'arthrose, ainsi que les maladies neurodégénératives, mais les mécanismes moléculaires entrant en jeu ne sont pas encore pleinement élucidés (Brieger *et al.*, 2012; Fulda *et al.*, 2010; Klaunig *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2006; Ziech *et al.*, 2010).

1.2 Forte dose de stress et induction de la mort cellulaire

1.2.1 Présentation de l'apoptose

1.2.1.1 Description générale

L'apoptose est une voie de mort cellulaire hautement conservée et régulée. Lors de ce processus, les cellules sont éliminées par « autodestruction ». L'apoptose est essentielle pour les organismes pluricellulaires, puisqu'elle permet, entre autres, l'élimination des cellules inutiles, mais également des cellules potentiellement dangereuses, durant le développement (Prindull, 1995). L'apoptose peut être déclenchée par de nombreux stress, tels que les radiations ionisantes, le manque de nutriments, le stress oxydatif, l'hypoxie et l'exposition à des produits chimiques comme les pesticides ou des médicaments chimiothérapeutiques. Le dérèglement de l'apoptose a été mis en relation avec le développement de nombreuses maladies comme l'inflammation chronique, l'athérosclérose, le cancer et certaines maladies neurodégénératives (Thompson, 1995).

L'apoptose est un processus qui a été très étudié, et dont la régulation est très documentée. Elle présente des caractéristiques morphologiques et biochimiques bien particulières : contraction des cellules, condensation et fractionnement de la chromatine et du noyau, formation de corps apoptotiques et digestion finale par les phagosomes (Hacker, 2000) (Fig. 1.2). En conservant l'intégrité de la membrane plasmique, l'apoptose permet d'éviter le déversement du contenu du cytosol dans le milieu extracellulaire, et ainsi d'éviter l'inflammation des tissus, contrairement à la nécrose (Edinger et Thompson, 2004). L'apoptose peut être activée par de nombreux signaux intrinsèques et extrinsèques.

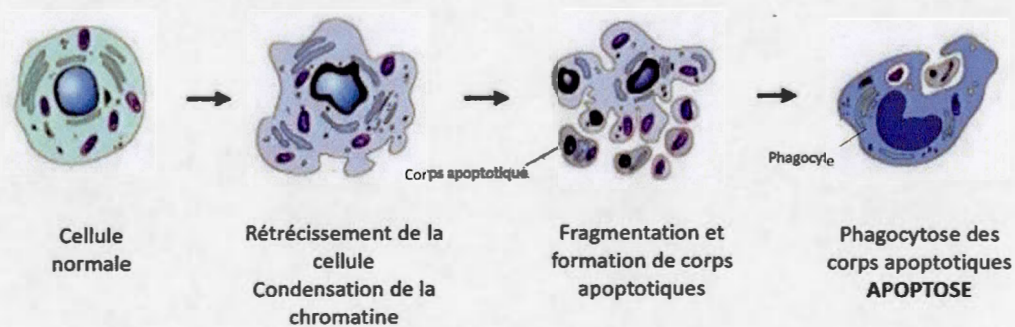


Fig. 1.2 : Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et la condensation de sa chromatine. La cellule est ensuite fragmentée en corps apoptotiques, sans que l'intégrité de la membrane plasmique ne soit compromise, avant digestion par les phagocytes. Adapté de (Kerr *et al.*, 1994)

1.2.1.2 Principaux mécanismes de régulation

La plupart des voies de l'apoptose conduisent à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases (Olsson et Zhivotovsky, 2011). Jusqu'à présent, quatorze caspases ont été identifiées en se basant sur des critères d'homologie de séquence en acides aminés. Certaines sont classifiées comme caspases apoptotiques (caspases-2, -3, -4, -6, -7, -8, -9, -10, -12) tandis que les autres sont pro-inflammatoires (caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13). Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogènes inactifs.

Lors d'un stimulus de mort cellulaire, les caspases apoptotiques sont activées par clivage protéolytique, soit par dimérisation induite par la proximité, soit par recrutement au sein de complexes (Riedl et Shi, 2004). Les caspases activées reconnaissent une séquence particulière d'acides aminés et sont capables d'hydrolyser la liaison peptidique présente au niveau de l'extrémité carboxyle d'un résidu aspartate. Les substrats des caspases comprennent des protéines structurales, telles que l'actine, la lamine A, la gelsoline et la fodrine, ainsi que des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme la poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP) et dans la régulation du cycle cellulaire comme p21, la E3-ubiquitine-protéine ligase et l'initiateur de l'ADNase activée par les caspases (ICAD) (Pallepati et Averill-Bates, 2012). Elles peuvent également cliver d'autres caspases apoptotiques, ce qui conduit à leur activation en cascade (Salvesen et Riedl, 2008). En effet, les caspases apoptotiques comprennent des caspases initiateurs, comme les caspases-2, -8, -9, -10, des caspases effectrices, telles que les caspases -3, -6 -7, ainsi que des caspases qui ont des rôles à la fois dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose, comme la caspase-2. L'activation des caspases effectrices de l'apoptose conduit à l'apparition du phénotype morphologique caractéristique de l'apoptose (Wyllie, 2010).

Les caspases sont au cœur du déclenchement de l'apoptose et sont de bons marqueurs de son activation. En amont de la stimulation des caspases, l'apoptose peut être déclenchée par l'intermédiaire de trois voies principales, impliquant soit les mitochondries, soit les récepteurs de mort localisés à la surface des cellules, soit le réticulum endoplasmique (RE).

1.2.1.2.a Voie mitochondriale (intrinsèque)

Les mitochondries sont des organites essentiels à la survie cellulaire, puisqu'elles sont le siège de la conversion des nutriments en énergie sous forme d'ATP. La structure des mitochondries est en relation avec leur fonction : elles possèdent deux membranes; l'une externe, perméable aux molécules de moins de 5 kDa et permettant l'importation

des substrats de la chaîne respiratoire et l'exportation des produits vers le cytosol, et l'autre interne et imperméable, ce qui est une caractéristique essentielle pour la génération d'un potentiel électrochimique nécessaire à la synthèse d'ATP.

Les mitochondries ont également un rôle très important dans le déclenchement et la régulation de l'apoptose. La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale ainsi que l'induction d'un complexe de transition de perméabilité membranaire sont clefs dans l'activation de cette voie de l'apoptose (Bernardi, 2013; Halestrap, 2009; Martinou et Youle, 2011). La perméabilité de la membrane externe mitochondriale est régulée par les protéines de la famille « B-cell-lymphoma protein 2 » (Bcl-2), dont les membres présentent au moins un domaine « Bcl-2 homology domain 3 » (BH3), qui est essentiel pour leur fonction. Certains membres de cette famille sont pro-apoptotiques, comme Bad, Bak, Bax, Bid, Bik, Bim, Bmf, Hrk, Puma et Noxa, tandis que d'autres sont anti-apoptotiques, comme Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, A1 et Mcl-1. L'équilibre entre les facteurs pro- ou anti-apoptotiques de cette famille de protéines régule la perméabilité de la membrane externe mitochondriale (Leibowitz et Yu, 2010; Ola *et al.*, 2011). En effet, en conditions normales, les facteurs anti-apoptotiques inhibent les facteurs pro-apoptotiques présents au sein du cytosol. En revanche, en conditions de stress, les protéines pro-apoptotiques Bax, Bad et Bid sont activées et transloquent au niveau de la mitochondrie, où ils s'associent au niveau de la membrane externe, conduisant à la formation de pores (Pallepati et Averill-Bates, 2012).

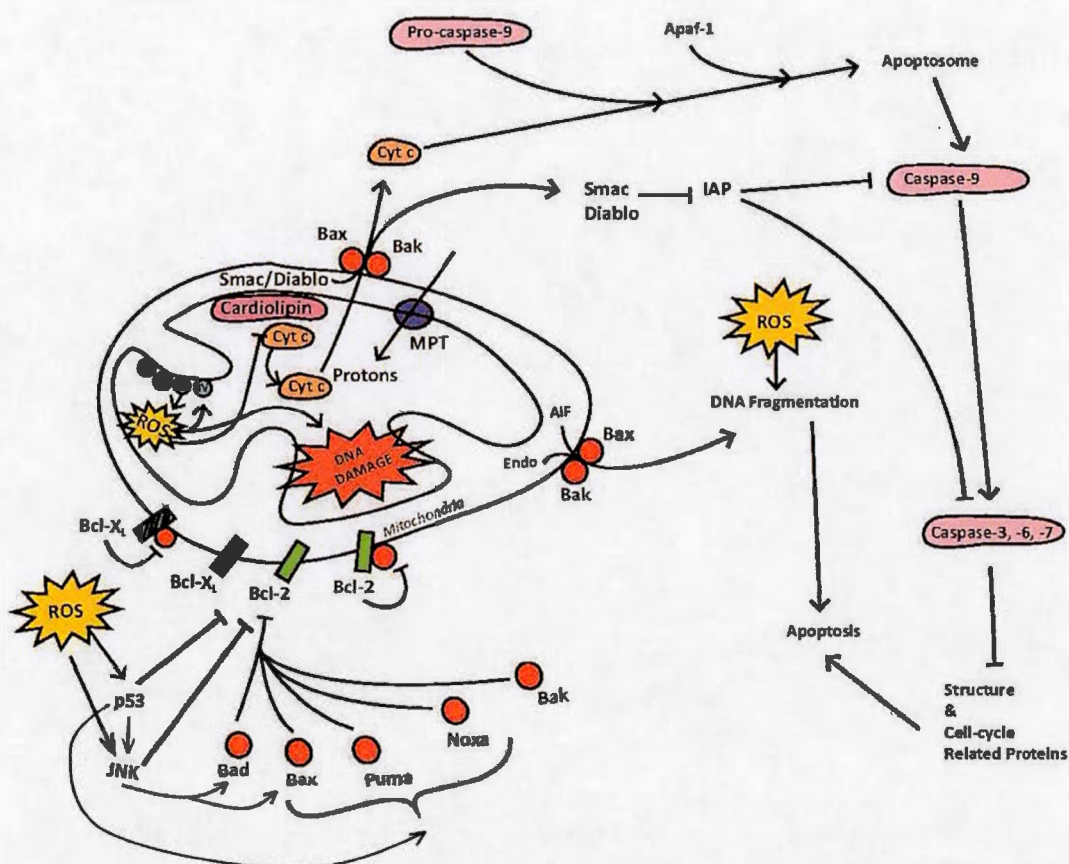


Fig. 1.3 : Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie de la mitochondrie

La voie mitochondriale de l'apoptose est activée en réponse au stress dû aux ERO (ROS) lorsque l'équilibre en facteurs pro-(Bad, Bax, Puma, Noxa, Bak) et anti-(Bcl-2, Bcl-X_L) apoptotiques de la famille Bcl-2 sont en déséquilibre en faveur de l'apoptose et que le complexe de perméabilité transitoire (MPT) est activé. Ceci cause la sortie de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie, comme Endo G et AIF, qui induisent la fragmentation de l'ADN, ou comme le cytochrome c et Smac/Diablo, qui activent l'apoptose dépendante des caspases. Le cytochrome c s'associe à la pro-caspase-9 et à Apaf-1 au sein d'un apoptosome, conduisant à l'activation de la caspase-9, tandis que Smac/Diablo piège l'inhibiteur de caspases IAP. La caspase-9 active ensuite les caspases effectrices, qui clivent à leur tour des protéines, notamment structurales. Ces événements conduisent à l'apoptose. Les ERO (ROS) peuvent également favoriser l'apoptose par la voie mitochondriale en libérant le cytochrome c dans la matrice par oxydation des cardiolipines, ou en causant des dégâts au niveau de l'ADN mitochondrial. Elles peuvent aussi activer directement p53, ou JNK et causer des dommages directs à l'ADN.

De plus, en conditions de stress, la perméabilité de la membrane interne augmente, ce qui permet la diffusion de molécules de moins de 1,5 kDa vers la matrice mitochondriale. Parmi ces facteurs se trouvent notamment des protons, ce qui perturbe le gradient électrochimique permettant la synthèse d'ATP (Ly *et al.*, 2003). De plus, la diffusion de ces molécules entraîne une augmentation de la pression osmotique au sein de la matrice, ce qui cause la compression de vésicules créées par les repliements de la membrane interne. Ces événements, associés à l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe, conduisent à la libération de facteurs pro-apoptotiques au sein du cytosol, tels que le cytochrome c (Cyt c), le facteur inducteur de l'apoptose (AIF), l'endonucléase G (Endo G), et la protéine Smac/Diablo. Ces facteurs induisent l'apoptose d'une façon dépendante ou non des caspases (Mayer et Oberbauer, 2003). En effet, suite à sa libération, Smac/Diablo peut se fixer à des protéines capables de piéger les caspases (IAP), ce qui entraîne la libération de ces dernières. De plus, le cytochrome c s'associe au facteur activateur de l'apoptose 1 (Apaf-1) et à la procaspase-9, formant ainsi un apoptosome. La formation de ce complexe conduit à l'auto-activation de la caspase-9, qui est capable d'activer à son tour les caspases-3, -6 et -7 (Huttemann *et al.*, 2011). L'activation de la caspase-9 est donc un événement clef de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Par ailleurs, AIF et Endo G induisent l'apoptose indépendamment des caspases, en étant transloquées vers le noyau et en se fixant directement sur l'ADN, ce qui conduit à la condensation de la chromatine et à la fragmentation de l'ADN (Ola *et al.*, 2011) (Fig. 1.3).

1.2.1.2.b Voie des récepteurs de mort (extrinsèque)

L'apoptose peut également être activée de façon extrinsèque, par une voie impliquant les récepteurs de mort (DR) transmembranaires présents au niveau de la membrane plasmique des cellules. Ces récepteurs présentent un domaine de mort (DD) au niveau intracellulaire et comprennent les récepteurs TNF1 (TNF-R1 ou DR-1), les récepteurs Fas (DR-2, CD95 ou APO-1), DR-3 (APO-3 ou TRAMP), le récepteur «

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand » (TRAIL) -1 (TRAIL-R1 ou DR-4), TRAIL-R2 (DR-5 ou KILLER) et DR-6 (Mahmood et Shukla, 2010).

L'apoptose impliquant les récepteurs de mort peut être déclenchée par l'intermédiaire des DR-2, lorsqu'il y a fixation d'un ligand Fas (FasL) au niveau d'un récepteur Fas qui lui est spécifique, ce qui induit la trimérisation du récepteur. Cette étape est essentielle pour le recrutement du domaine de mort associé au Fas (FADD) et la formation d'un complexe de signalisation induisant la mort (DISC) au niveau de la surface interne de la membrane plasmique. Le domaine effecteur de FADD interagit ensuite avec les domaines effecteurs de mort des caspases-8 (ou -10), ce qui conduit à leur auto-activation. Ces dernières activent d'autres caspases effectrices comme les caspases-3, -6 et -7, ce qui déclenche directement l'apoptose (Mahmood et Shukla, 2010). Par ailleurs, les caspases-8 actives peuvent également cliver Bid, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, en t-Bid, ce qui modifie l'équilibre entre facteur pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en faveur de la mort cellulaire et peut donc activer la voie mitochondriale de l'apoptose (Kantari et Walczak, 2011). De plus, en réponse à un stress intense, la protéine associée à la mort 6 (Daxx) peut interagir avec le domaine de mort de Fas, ce qui conduit à l'activation de la kinase signal de l'apoptose (ASK-1), qui induit ensuite c-Jun N-terminal kinase (JNK). JNK phosphoryle Bcl-2 et inhibe ses propriétés anti-apoptotiques. La voie apoptotique impliquant les récepteurs TRAIL-R1 et -R2 est très semblable à celle déclenchée par Fas, mais impliquent des ligands TRAIL (Holoch et Griffith, 2009; Pennarun *et al.*, 2010) (Fig. 1.4).

La caspase-8 est centrale dans l'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort. De plus, la caspase-2, pourrait avoir un rôle important dans la régulation de l'apoptose, puisqu'elle est activée en réponse à de nombreux stress (Bouchier-Hayes et Green, 2012; Dorstyn *et al.*, 2012). Cependant, les mécanismes à l'origine de son activation sont mal identifiés. En effet, la caspase-2 peut s'associer avec la protéine inductible par p53 présentant un domaine de mort (PIDD) et avec la protéine associée

à RIP présentant un domaine de mort (RAIDD), formant ainsi un PIDDosome. Ce complexe semble nécessaire au clivage et à l'activation de la caspase-2 lorsque l'ADN cellulaire est endommagé (Vakifahmetoglu-Norberg et Zhivotovsky, 2010). Les caspases-2 peuvent également être activées par leur recrutement au niveau du DISC et leur clivage subséquent par les caspases-8 (Olsson *et al.*, 2009). La caspase-2 pourrait activer des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux comme t-Bid (Guo *et al.*, 2002).

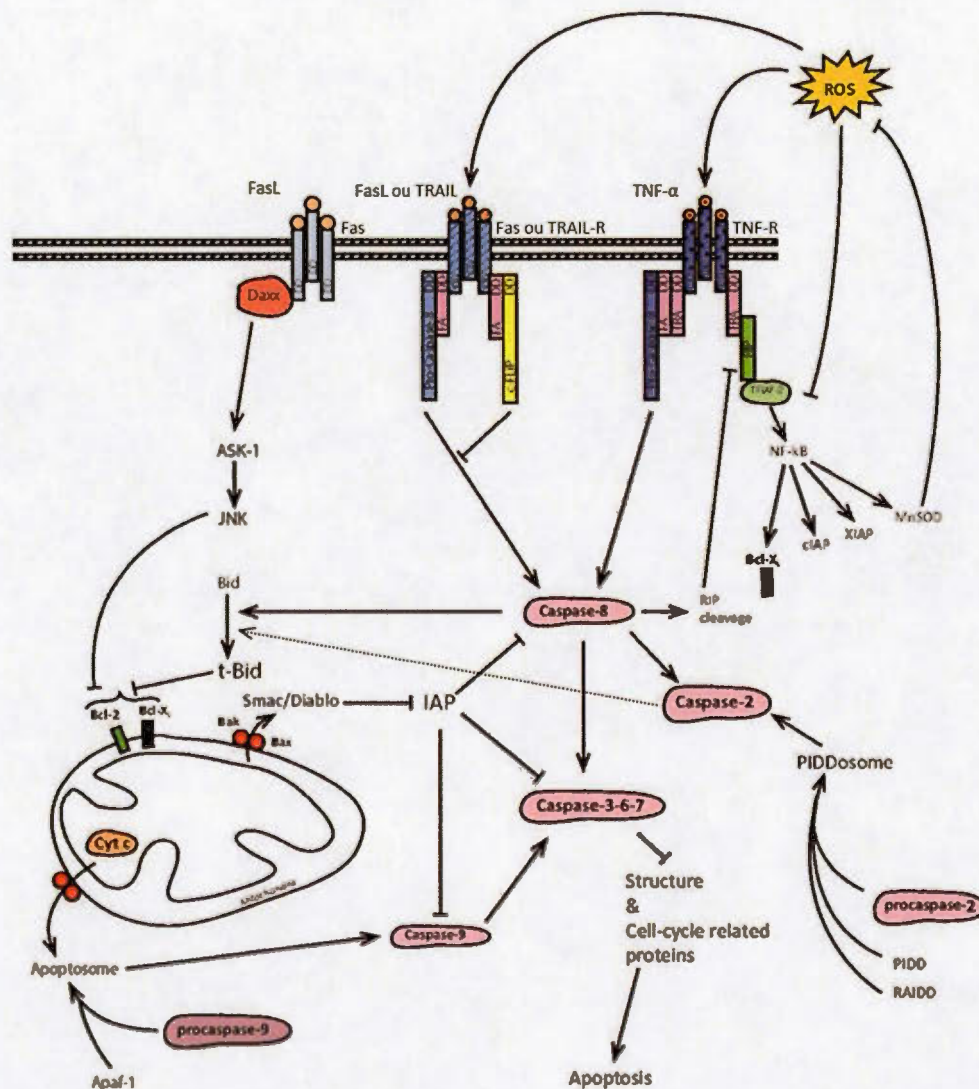


Fig. 1.4 : Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort

La voie des récepteurs de mort de l'apoptose est activée en réponse aux ERO (ROS) lorsqu'un ligand (FasL, TRAIL ou TNF-α) se fixe au niveau de son récepteur de mort spécifique (FAS, TRAIL-R ou TNF-R). Ces événements déclenchent le recrutement et l'activation de la caspase-8. Celle-ci peut soit activer les caspases effectrices, déclenchant l'apoptose par la voie des récepteurs de mort, soit cliver et activer le facteur pro-apoptotique Bid directement ou par l'intermédiaire de l'activation de la caspase-2, induisant l'apoptose par la voie mitochondriale (voir Fig. 1.3). La caspase-2 peut être également activée au sein du PIDDosome, constitué de la pro-caspase-2, de PIDD et RAIDD. La caspase-8 inhibe également la voie de survie impliquant RIP/NF-κB.

1.2.1.2.c Voie du réticulum endoplasmique (extrinsèque)

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organe essentiel, impliqué dans les modifications post-traductionnelles, dans le repliement et l'adressage des protéines néo-synthétisées et dans la régulation du flux calcique, dont il est un lieu de stockage majeur. Cet organe joue également un rôle important dans la survie et la mort cellulaire. Lorsqu'un stimulus adverse atteint la cellule, des protéines endommagées peuvent s'accumuler au sein du RE, ce qui déclenche le stress du RE, et peut conduire à l'induction de l'apoptose (Tabas et Ron, 2011) (Fig. 1.5).

L'induction de l'apoptose via le RE pourrait faire intervenir la sérine/thréonine-protéine kinase/endoribonucléase dépendante de l'inositol (IRE-1 α) (Rasheva et Domingos, 2009). En effet, lors d'un stress du RE prolongé, IRE-1 α peut interagir avec le facteur associé au TNF-R2 (TRAF-2), qui recrute et active ensuite la kinase régulant le signal de l'apoptose 1 (ASK-1), ce qui conduit à la phosphorylation et l'activation de la kinase c-Jun (JNK), à l'inhibition de Bcl-2 et à l'induction de l'apoptose (Malhotra et Kaufman, 2007). Cette voie fait intervenir des protéines de la famille Bcl-2 localisées au niveau du RE : les facteurs anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-X_L présents au niveau du RE sont capables d'inhiber l'apoptose et de réguler l'homéostasie calcique du RE, tandis que les facteurs pro-apoptotiques de cette famille de protéine tels que Bax et Bak sont capables d'activer l'efflux de calcium depuis le RE vers le cytosol puis vers la mitochondrie (Breckenridge *et al.*, 2003). Or, un influx massif ou prolongé de calcium au sein de la mitochondrie favorise la libération de facteurs pro-apoptotiques, tels que le Cyt c dans le cytosol, conduisant à l'apoptose (Pizzo et Pozzan, 2007).

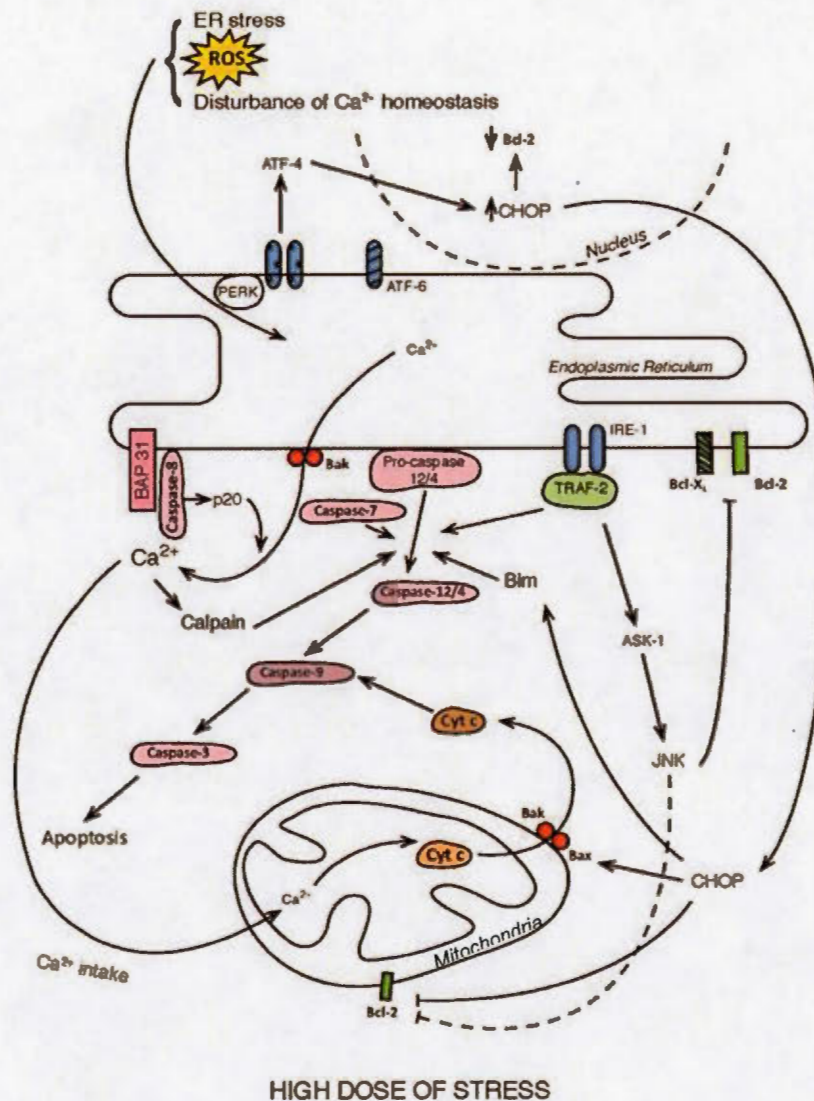


Fig. 1.5 : Mécanismes d'activation de l'apoptose par la voie du réticulum endoplasmique

Lors d'un stress du RE, IRE-1 α peut s'associer avec TRAF-2, conduisant l'activation de JNK par l'intermédiaire de ASK-1 et à l'inhibition des facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 au niveau du RE. Les facteurs pro-apoptotiques facilitent la sortie de Ca^{2+} , activant la calpaine et stimulant l'apoptose mitochondriale. CHOP peut également être induit en réponse au stress du RE, est capable d'inhiber Bcl-2, d'activer l'expression de Bim et d'induire la translocation de Bax vers la mitochondrie. La caspase-7, la calpaine, TRAF-2 et Bim, peuvent activer la caspase-4/12, qui induit ensuite la caspase-9, puis les caspases effectrices, conduisant à l'apoptose.

Cet efflux de calcium depuis le RE vers le cytosol pourrait également activer les calpaines, qui sont des protéases à cystéines activées par le calcium. Les deux plus étudiées sont la μ -calpaine, qui est activée par des concentrations de calcium de l'ordre du micromolaire, et la m-calpaine, qui est activée par des doses de l'ordre du millimolaire. Chez les souris, il a été mis en évidence que suite au stress du RE, l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire active la m-calpaine, qui est transloquée vers la membrane du RE, où elle est capable de cliver la pro-caspase-12 présente au niveau de la face cytosolique de la membrane du RE (Nakagawa et Yuan, 2000; Tan *et al.*, 2006). L'activation de la caspase-12 a été mise en relation avec sa translocation au niveau de la mitochondrie où elle clive la pro-caspase-9, qui active ensuite la caspase-3 d'une façon indépendante de la voie mitochondriale de l'apoptose (Szegezdi *et al.*, 2003). La caspase-12 induirait aussi le clivage des protéines Bcl-X_L, et favoriserait ainsi l'apoptose (Nakagawa et Yuan, 2000). Cependant, les membres de la famille Bcl-2 pourraient également intervenir dans l'activation de la caspase-12. En effet, Bim pourrait cliver et activer la caspase-12, tandis que Bcl-X_L pourrait se dimériser avec la caspase-12 et ainsi l'inhiber (Breckenridge *et al.*, 2003).

Cependant, la caspase-12 pourrait être activée par d'autres voies. Ainsi, dans des conditions d'homéostasie, la pro-caspase-12 pourrait interagir avec IRE1 α par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice TRAF-2. Une situation de stress du RE pourrait entraîner sa dissociation de TRAF-2 et son auto-activation. La pro-caspase-12 peut également être activée par l'intermédiaire de la caspase-7, après translocation de celle-ci proche de la membrane du RE en réponse au stress du RE (Rao *et al.*, 2001). Ce dernier mécanisme serait dépendant de la protéine régulée par le glucose GRP78, elle-même activée par des inducteurs du stress du RE (Momoi, 2004). Par ailleurs, la caspase-12 pourrait être clivée au niveau de ses deux extrémités terminales puis transloquée vers le noyau, ce qui activerait l'apoptose (Fujita *et al.*, 2002). Chez l'Homme, la plupart des cellules ne présentent pas de caspase-12 fonctionnelle, il est

donc possible que son équivalent, la caspase-4, réalise cette fonction (Hitomi *et al.*, 2004; Momoi, 2004; Palapati et Averill-Bates, 2011a; Yamamuro *et al.*, 2011).

Par ailleurs, l'apoptose induite par l'intermédiaire du RE pourrait faire intervenir le facteur de transcription protéique homologue à C/EBP (CHOP). Celui-ci est en effet induit en réponse au stress du RE, par l'intermédiaire du facteur de transcription activateur (ATF6) ou de la « protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase » (PERK), et est capable d'inhiber Bcl-2 en réprimant son promoteur, ainsi que d'activer l'expression de Bim et d'induire la translocation de Bax vers la mitochondrie (Malhotra et Kaufman, 2007; Rasheva et Domingos, 2009).

Le stress du RE pourrait aussi induire la formation d'un complexe entre BAP31, une protéine de la membrane du RE, et la caspase-8, ce qui conduirait à la formation d'un fragment p20 capable d'induire la mort cellulaire. Le mécanisme impliquerait un efflux de calcium depuis le RE et le recrutement de protéines impliquées dans la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui déclencherait la libération de Cyt c et induirait la mort cellulaire (Breckenridge *et al.*, 2003).

1.2.1.3 Apoptose et stress oxydatif

Le stress oxydatif a été mis en relation étroite avec l'induction de l'apoptose (Franco *et al.*, 2009). Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur important dans ce lien. En effet cette protéine est primordiale dans la régulation des réponses des cellules aux stress et peut soit induire l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation des dommages et le retour à l'homéostasie cellulaire, soit activer l'apoptose (Hu *et al.*, 2012). Dans des conditions normales, p53 est présent à très faible niveau au sein des cellules car il est ubiquitiné par l'E3 ubiquitine ligase mdm2 et ciblé pour une dégradation protéosomale. Cependant, lorsque la cellule subit un stress, tel que le stress oxydatif, p53 est libéré de mdm2, stabilisé par des modifications post-traductionnelles et tétramérisé avant d'être transloqué au sein du noyau où il s'associe à l'ADN au

niveau de promoteurs de gènes (Hock et Vousden, 2014). Si le stress est faible, p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, favorisant la survie. Cependant, si les dégâts sont trop importants, p53 active la transcription de gènes codant pour des protéines induisant l'apoptose par les voies intrinsèques, comme Bax, Bid, Puma, Noxa et Apaf-1, mais également extrinsèques, comme Fas, DR-4 et DR-5 (Fig. 1.3, 1.4) (Franco *et al.*, 2009; Yoshida et Miki, 2010). De plus, toujours en réponse aux stress tels que le stress oxydatif, p53 peut être transloqué au niveau des mitochondries, où il peut interagir avec des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1, favorisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le Cyt c dans le cytosol. Puma et Noxa peuvent également être induits par p53 suite à des dommages à l'ADN (Palapati et Averill-Bates, 2012) (Fig. 1.3). Par ailleurs, p53 pourrait activer des voies conduisant à la production d'ERO, et donc intervenir dans la régulation du statu redox cellulaire (Maillet et Pervaiz, 2012).

De plus, le contrôle de l'apoptose par le stress oxydatif pourrait impliquer des oxydations post-traductionnelles des caspases. Ainsi, il a été montré que les caspases-3, -8 et -9 pouvaient être oxydées par le H₂O₂ au niveau de cystéines présentes au sein de leur site catalytique, mais le contrôle de ce processus et ses conséquences pour l'induction de l'apoptose ne sont pas encore compris (Circu et Aw, 2010).

En outre, les ERO ont été mises en relation avec l'activation de l'apoptose à travers les trois voies d'induction. En effet, les mitochondries sont le lieu principal de production des ERO (Dickinson et Chang, 2011). Ces réactifs sont capables de cibler des structures relativement proches telles que l'ADN mitochondrial ainsi que les complexes de la chaîne respiratoire, perturbant ainsi le transfert des électrons et causant la perte du potentiel et de l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale (Ott *et al.*, 2007a). Ces événements, associés au recrutement de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, marquent l'activation de l'apoptose (Czabotar *et al.*, 2014;

Stephenson, 2010). De plus, les ERO sont capables d'oxyder d'autres éléments tels que les cardiolipines, qui permettent l'ancrage des Cyt c au niveau de la membrane interne mitochondriale (Ott *et al.*, 2007b) (Fig. 1.3). L'oxydation des cardiolipines entraîne la libération de Cyt c, qui pourra potentiellement diffuser vers le cytosol si la perméabilité membranaire le permet. Par ailleurs, l'activation de JNK en réponse au stress oxydatif peut causer la phosphorylation et l'inactivation de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ainsi que l'activation des protéines pro-apoptotiques de cette famille (West et Marnett, 2006) (Fig. 1.3). Enfin, il a été montré, chez des cellules de carcinome cervical humain HeLa, que le H₂O₂ était capable d'induire l'apoptose par la voie mitochondriale, de façon à la fois dépendante et indépendante des caspases (Pallepati et Averill-Bates, 2010).

Le stress oxydatif a également été mis en relation avec l'activation de l'apoptose par la voie extrinsèque. En effet, dans des conditions normales, le facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B) induit la transcription de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques telles que IAP et Bcl-X_L (Wang *et al.*, 1998), et inhibe l'activation de la caspase-8, empêchant ainsi l'induction de l'apoptose par la voie des TNF-R. Or le H₂O₂ peut inhiber très fortement NF- κ B et ainsi favoriser l'apoptose. Au sein des cellules HeLa, le H₂O₂ active la liaison du FasL avec son récepteur et induit l'auto-activation des caspases-8 ainsi que l'activation des caspases-2 par les caspases-8, conduisant au clivage de Bid en t-Bid et à l'apoptose impliquant les mitochondries (Pallepati et Averill-Bates, 2011b). Dans d'autres lignées cellulaires, les ERO sont impliquées dans l'apoptose induite via les ligands TRAIL et TNF- α (Circu et Aw, 2010) (Fig. 1.4).

Enfin, au sein de la lumière du RE, l'existence d'un environnement pro-oxydant est nécessaire pour la formation de liaisons disulfures au sein des protéines néo-synthétisées. Cette réaction est réalisée par la protéine disulfide isomérase (PDI), qui est la chaperonne la plus abondante au sein du RE et qui est réduite lors du processus.

La RE oxydase est capable de régénérer les PDI oxydées, mais cette réaction libère des ERO (Malhotra et Kaufman, 2007). De plus, l'activité des PDI ainsi que de la RE oxydase sont contrôlées par des modifications oxydatives. Ainsi le système de défense antioxydant du RE est essentiel pour le maintien de l'homéostasie redox du RE. En conditions stressantes, comme lors d'un stress oxydatif, CHOP est induit. Ce facteur active la transcription de la RE oxydase, ce qui pourrait conduire à une ré-oxydation des PDI en série ainsi qu'à une surproduction d'ERO au sein du RE, favorisant la formation de liaisons disulfures surnuméraires et l'accumulation de protéines mal-repliées (Tabas et Ron, 2011). Ces événements sont clefs dans le déclenchement de l'apoptose dépendant du RE. Par ailleurs, l'oxydation d'ASK-1 par la thiorédoxine est une étape nécessaire pour la conjugaison d'ASK-1 avec TRAF-2, qui conduit à l'activation de JNK et ainsi déclenche l'apoptose via le stress du RE (Circu et Aw, 2010) (Fig. 1.5).

1.2.2 Présentation de la nécrose

La nécrose est un type de mort cellulaire caractérisé par l'augmentation du volume de la cellule, accompagné de son arrondissement, du gonflement de ses organites et de la rupture de sa membrane plasmique (Fig. 1.6). Cette lyse cause le déversement du contenu cellulaire, et notamment de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs), dans le milieu environnant, ce qui peut promouvoir l'inflammation. Lors de la nécrose, bien que la morphologie de l'ADN soit modifiée, la fragmentation caractéristique de l'apoptose n'est pas observée (Edinger et Thompson, 2004).

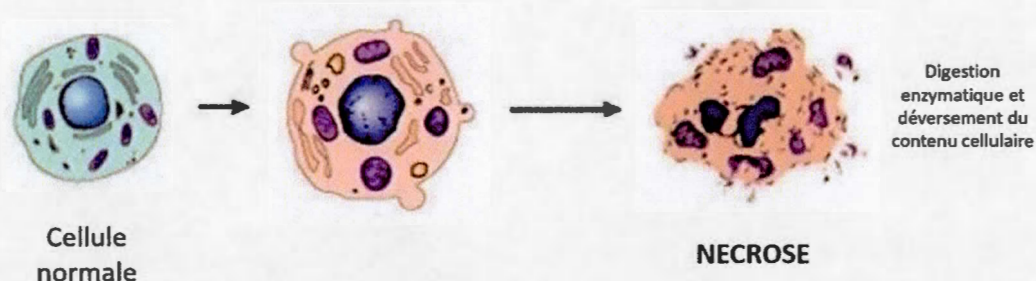


Fig. 1.6 : Caractéristiques morphologiques de la nécrose

La nécrose est un type de mort cellulaire caractérisé par l'augmentation du volume cellulaire et la lyse des cellules et des organites, conduisant à leur déversement dans le milieu environnant, ce qui peut promouvoir l'inflammation. Adapté de (Kerr *et al.*, 1994)

La nécrose a longtemps été considérée comme un type de mort cellulaire accidentel, se déroulant lorsque l'apoptose était inhibée ou que le stress subi par la cellule était trop intense pour permettre la mise en place d'une réponse apoptotique. Cependant, de plus en plus de signaux capables de déclencher la nécrose sont mis à jour. L'une des voies les plus étudiées implique les kinases qui interagissent avec des récepteurs (RIPK1 et 3), qui sont activées par l'intermédiaire de la stimulation des récepteurs TNF, et déclencheraient un type de nécrose très régulé, qualifié de « nécroptose » (Vanlangenakker *et al.*, 2012). Ainsi, la stimulation des récepteurs TNF pourrait induire l'apoptose, mais également la nécrose (Portt *et al.*, 2011; Weinlich *et al.*, 2011).

1.3 Faible dose de stress et induction des systèmes de défense adaptatifs : thermotolérance (40°C)

Si de fortes doses de stress stimulent la mort cellulaire, des doses de stress sub-létales sont capables d'activer des systèmes de défense cellulaires. Ceux-ci protègent les cellules en piégeant des molécules effectrices des voies de mort, notamment. Leur

activation confère une plus grande résistance à la mort cellulaire lors de l'exposition à un stress ultérieur (Portt *et al.*, 2011).

1.3.1 Réponse adaptatrice de thermotolérance (40°C)

La thermotolérance est définie comme la capacité d'un organisme et/ou de cellules à résister à des températures normalement létales. L'exposition transitoire de cellules à de faibles augmentations de température induit une réponse adaptative transitoire permettant la survie lors de l'exposition à un stress thermique ultérieur. Cependant, elle rend également les cellules d'avantage résistantes lors de l'exposition à d'autres stress, tels qu'une forte dose de stress oxydatif, de radiations ionisantes, ou de toxiques environnementaux (Martindale et Holbrook, 2002; Przybytkowski *et al.*, 1986). Elle peut être induite suite à une exposition à des températures sub-létales, de l'ordre de celles caractéristiques de la fièvre (39,5-41,5°C), durant un temps relativement long (3-24h) (Przybytkowski *et al.*, 1986), ou suite à une exposition brève (<30 min) à des températures potentiellement létales (42-45°C) (Landry *et al.*, 1982).

L'induction de la thermotolérance à 40°C est associée à des changements dans l'expression de gènes et de protéines impliquées dans les systèmes de défense, comme les protéines de choc thermique (HSP), les défenses antioxydantes, les protéines anti-apoptotiques, ainsi que dans les défenses du RE (Fig. 1.7) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Palapati et Averill-Bates, 2010; Palapati et Averill-Bates, 2011a).

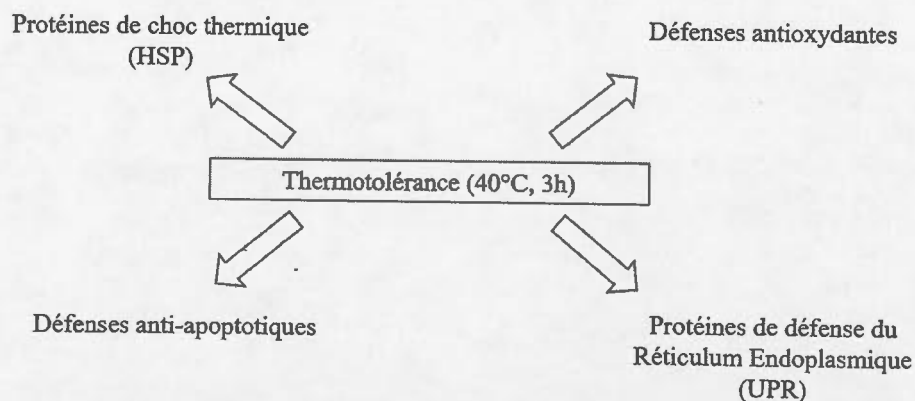


Fig. 1.7 : Systèmes de défenses induits par la thermotolérance (40°C)

Des protéines de choc thermique, des défenses antioxydantes et anti-apoptotiques ainsi que du réticulum endoplasmique sont induites après une exposition de 3h à 40°C.

1.3.2 Systèmes de défense induits par la thermotolérance

1.3.2.1 Protéines de choc thermique

Les HSP existent chez tous les organismes. Elles ont été classées en six catégories, selon leur poids moléculaire (Hsp100, 90, 70, 60, 40 et petites HSP). Elles peuvent être exprimées de façon constitutive et assister le repliement des protéines néo-synthétisées ou dénaturées, ou être induites en réponse à divers stress (Martindale et Holbrook, 2002). Leur expression, qui est sous contrôle de facteurs de transcription de choc thermique (HSF), est augmentée en réponse à des stress environnementaux capables de dénaturer ou perturber le repliement des protéines, comme le stress thermique, le stress oxydatif, ou l'exposition aux métaux lourds. Elle est également amplifiée en réponse à des stress physiologiques tels que l'inflammation ou la fièvre (Kregel, 2002; Portt *et al.*, 2011).

L'accumulation de HSP est clef dans le développement de la thermotolérance (40°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008, 2015). En effet, suite à une faible élévation de température, le facteur de transcription HSF-1 est libéré de sa protéine inhibitrice, Hsp90, se trimérise, puis transloque au sein du noyau, où le complexe

s'associe à l'ADN, activant l'expression des HSP, qui s'accumulent au sein ces cellules (Pirkkala *et al.*, 2001). Suite à l'augmentation de leur expression, les HSP protègent les cellules des stress toxiques du fait de leurs propriétés anti-apoptotiques (Fulda *et al.*, 2010). En effet, il a été montré que l'induction des protéines Hsp27, 32, 60 72, 90 et 110 protégeait les cellules contre l'apoptose induite notamment par le stress thermique et le stress oxydatif (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008). Par exemple, Hsp27 peut activer le système antioxydant cellulaire, mais également se fixer sur le cytochrome c ou sur la pro-caspase-3, ce qui empêche leur activation (Fulda *et al.*, 2010). De plus, les Hsp70 peuvent inhiber la translocation ainsi que l'insertion de la protéine pro-apoptotique Bax au niveau de la membrane mitochondriale ainsi que le clivage de Bid en t-Bid par la caspase-8. Les Hsp70 et 90 sont également capables de se fixer au niveau de la protéine Apaf-1, ce qui empêche la formation de l'apoptosome et l'activation de la pro-caspase-9 en caspase-9 (Beere *et al.*, 2000).

1.3.2.2 Système de défense antioxydant

Il a été mis en évidence que le développement de la thermotolérance (40°C) est associé à l'induction des systèmes de défense antioxydants. En effet, l'exposition de cellules à de faibles augmentations de température (40°C, 3h) conduit à une augmentation du niveau d'ERO intracellulaire, à la surexpression et à l'amplification d'activité des protéines CAT et MnSOD, ainsi qu'à l'accroissement du niveau de GSH intracellulaire. Cette activation des systèmes de défense antioxydants est associé à une plus grande tolérance à l'apoptose induite par le stress oxydatif (Pallepati et Averill-Bates, 2010).

1.3.2.3 Systèmes de défense du réticulum endoplasmique

Le RE est très sensible à l'accumulation de protéines mal repliées à son niveau. Lorsqu'un stress modéré conduit à cette situation, une réponse adaptative, appelée « Unfolded Protein Response » (UPR) est activée (Malhotra et Kaufman, 2007) (Fig.

1.8). Trois mécanismes sont impliqués dans l'UPR : (i) la traduction est inhibée, ce qui diminue l'afflux de nouvelles protéines au sein du RE, (ii) la réponse « RE-associated protein degradation » (ERAD) est activée et permet la translocation des protéines mal repliées ou agrégées depuis le RE vers le cytosol, où elles seront ubiquitinées et dégradées par le protéasome et (iii) la transcription de gènes codant pour des chaperonnes, des molécules du ERAD et des antioxydants est activée (Cao et Kaufman, 2012a). Ces trois mécanismes sont régulés par trois protéines qui sont des détecteurs du stress du RE : IRE1- α , le facteur de transcription activateur 6 (ATF-6), et la « Protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) » (Walter et Ron, 2011). En l'absence de stress, ces trois protéines sont séquestrées au sein du lumen du RE par interaction avec les chaperonnes Bip. En réponse à des stress induisant une dénaturation des protéines (stress thermique, oxydatif ou métaux lourds, par exemple), Bip se fixe sur les protéines présentant des défauts de repliement et n'interagit plus avec les détecteurs, qui sont alors activés (Schroder et Kaufman, 2005). La forme activée d'IRE-1 α catalyse l'épissage alternatif de l'ARN messager de la protéine « X-Box binding protein » (XBP-1), ce qui conduit à l'expression d'un facteur de transcription XBP-1 fonctionnel. Ce facteur induit la transcription de gènes codant pour des chaperonnes présentes au niveau du RE, ce qui augmente la capacité de prise en charge des protéines endommagées par le RE. Lorsqu'ATF6 est libéré, il est transloqué au niveau du Golgi où il subit un double clivage et devient un facteur de transcription actif. Ce fragment d'ATF-6 est dirigé vers le noyau et stimule la synthèse de gènes impliqués dans l'UPR. Enfin, la forme activée de PERK phosphoryle l'« eukaryotic initiation factor 2 » (eIF2 α), qui est impliqué d'une part dans l'inhibition de la traduction générale des protéines, et d'autre part dans la traduction du facteur de transcription ATF4, qui active la transcription sélective de chaperonnes telles que Bip (Hetz, 2012).

Le développement de la thermotolérance à 40°C a été associé avec l'augmentation de l'expression des protéines PERK, et eIF2 α ainsi que de leurs formes phosphorylées (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Les transcrits de ATF6, Bip et PERK sont également activés (Bettaieb et Averill-Bates, 2015). L'activation de ces protéines de l'UPR a été mise en relation avec le retardement du déclenchement du stress du RE et de l'apoptose induite via le RE, par la diminution de l'activation de CHOP et des caspases-4/12 et -7 en réponse au peroxyde d'hydrogène (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Cependant, la thermotolérance a été associée avec une protection contre l'activation d'IRE-1 α et de sa forme phosphorylée induite par le peroxyde d'hydrogène. La thermotolérance protège également contre l'augmentation des protéines impliquées dans l'apoptose induite via le RE en réponse au stress thermique (42-43°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2015).

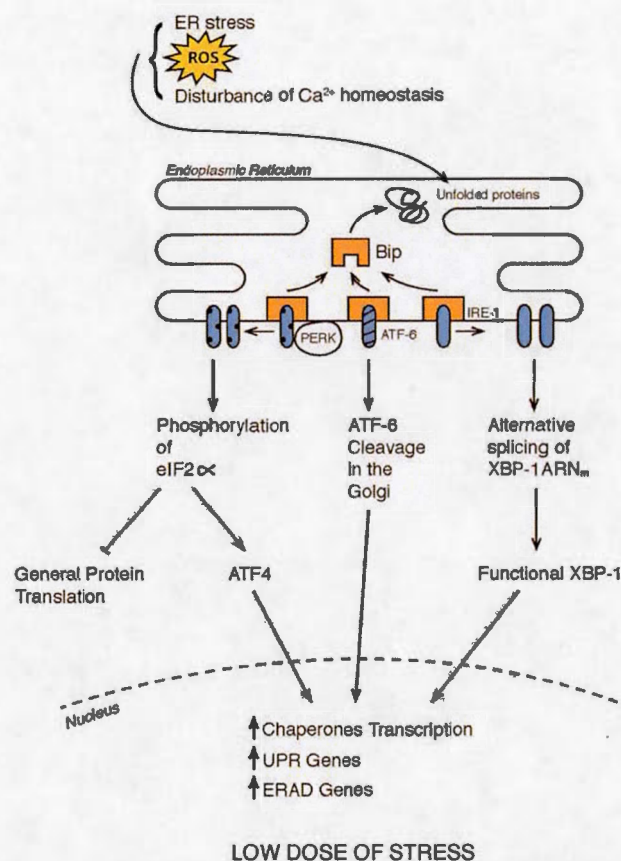


Fig. 1.8 : Voies de signalisation impliquées dans l' « Unfolded Protein Response »

Le stress du RE active trois senseurs, IRE-1 α , ATF6 et PERK, ce qui déclenche l'UPR. IRE-1 α catalyse l'épissage alternatif de l'ARNm de XBP1, conduisant à une forme active de la protéine, capable d'activer la transcription de chaperonnes. ATF6 est clivé dans le Golgi puis transloqué au niveau du noyau où il stimule la transcription de gènes cibles de l'UPR. PERK phosphoryle eIF2 α , conduisant à l'inhibition de la traduction générale et à la traduction spécifique d'ATF4, qui active la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress du RE.

1.3.2.4 Systèmes de défense anti-apoptotique

D'autres systèmes de défense permettant aux cellules de résister à l'induction de l'apoptose induite par d'importantes doses de stress sont activés suite à l'exposition à de faibles augmentations de température (40°C). Ainsi, l'expression des protéines de la famille Bcl-2 est modulée au sein de cellules thermotolérantes : les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L sont surexprimés tandis que les facteurs pro-apoptotiques Bax, Bak, Puma et Noxa sont sous-exprimés. La rupture de l'équilibre en faveur des facteurs anti-apoptotiques participe à la résistance des cellules thermotolérantes à l'apoptose induite par les stress (Glory *et al.*, 2014).

1.4 Autophagie

1.4.1 Description générale

L'autophagie est un processus catabolique durant lequel une vésicule contenant du matériel cellulaire à dégrader est acheminé vers les lysosomes, ce qui conduit à la dégradation acide du matériel. L'autophagie est un mécanisme très conservé chez les eucaryotes qui est impliqué dans le développement et dans l'homéostasie cellulaire. Trois types d'autophagie sont distinguables. Le premier, l'autophagie impliquant les chaperonnes, est un processus visant la dégradation de protéines cytosoliques spécifiques. Les chaperonnes Hsc70 reconnaissent les protéines à dégrader et se fixent au niveau d'un motif spécifique de type pentapeptide KFERQ présent à leur surface, avant de les acheminer au niveau des lysosomes. Le complexe chaperonne-protéine et un récepteur LAMP-2A, associé à la membrane du lysosome, se reconnaissent mutuellement, ce qui déclenche la dénaturation de la protéine et sa translocation au sein du lysosome, où elle est dégradée (Kaushik *et al.*, 2011). Le deuxième type d'autophagie est la micro-autophagie, qui consiste en l'invagination directe de la membrane du lysosome, conduisant à l'emprisonnement et à la dégradation de matériel

cytosolique (Li *et al.*, 2012). Enfin le troisième type, qui est le plus étudié et le mieux caractérisé, est la macro-autophagie. Elle est initiée par le développement d'un compartiment à double membrane appelé phagophore. La double membrane est allongée jusqu'à la formation d'une vésicule complète emprisonnant du matériel à dégrader (protéines, organites), appelée autophagosome. Cette vésicule fusionne avec un endosome, formant un amphisome, puis avec un lysosome, formant un autolysosome. Le matériel emprisonné est alors digéré par des hydrolases acides en ses constituants de base (acides aminés, acides gras,...) qui sont ensuite libérés dans le cytosol par l'intermédiaire de perméases. Ces constituants sont alors réutilisables par la machinerie cellulaire (Chen et Klionsky, 2011; Ravikumar *et al.*, 2006) (Fig. 1.9). Dans la littérature, le terme « autophagie » est le plus souvent utilisé pour faire référence à la macro-autophagie, et nous utiliserons également le terme générique « autophagie » dans la suite de ce document.

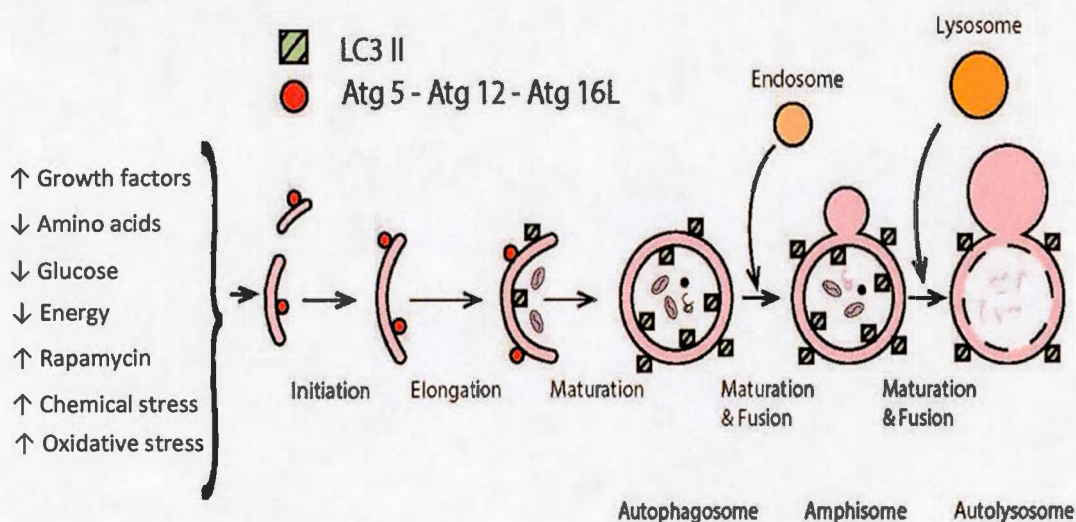


Fig. 1.9 : Principales étapes de l'autophagie (macroautophagie).

L'autophagie est caractérisée par la formation d'une vésicule englobant du matériel cytosolique appelée autophagosome, assistée par les complexes Atg5-Atg12-Atg16L et LC3II. L'autophagosome peut fusionner avec un endosome, formant un amphisome, puis avec un lysosome, formant un autolysosome. Cette voie est activée par les facteurs de croissance, la rapamycine et les stress et inhibée par les acides aminés, le glucose et un status énergétique fort. Adapté de (Ravikumar *et al.*, 2009).

1.4.2 Principaux mécanismes de régulation

L'autophagie est un processus hautement régulé, notamment par le statut énergétique et nutritionnel de la cellule. Elle est également induite par de nombreux stimuli stressants tels que l'hypoxie, le stress oxydatif et les infections de pathogènes. Elle est dérégulée dans le cas de nombreuses maladies neurodégénératives, notamment Alzheimer et Parkinson, ainsi que dans les cellules cancéreuses (Kroemer *et al.*, 2010). Depuis les années 1990, l'autophagie a été mise en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et des gènes impliqués dans sa régulation, appelés « autophagy related genes » (Atg) ont été identifiés. De nombreux homologues de ces gènes Atg ont ensuite été identifiés chez d'autres espèces, notamment chez les mammifères, ce qui a permis la caractérisation des mécanismes impliqués dans l'autophagie, ainsi que son rôle dans la physiologie et la physiopathologie (Klionsky *et al.*, 2010).

Chez les mammifères, la voie la plus classique et la mieux étudiée de régulation de l'autophagie implique la sérine/thréonine kinase cible de la rapamycine (mTOR). Ce facteur régule des fonctions cellulaires diverses, comme l'initiation de la traduction, la croissance cellulaire et la prolifération, la biogénèse des ribosomes ou la transcription. La voie mTOR implique deux complexes fonctionnels, mTORC1 et mTORC2. mTORC1 peut réguler l'autophagie en phosphorylant des protéines de la famille Atg ou en intervenant dans une cascade de signaux de transduction impliquant d'autres protéines régulant l'autophagie (Chen et Klionsky, 2011; Jung *et al.*, 2010). En revanche, mTORC2 est impliqué dans la régulation des protéines kinases B et C (Akt/PKB et PKC) (Jung *et al.*, 2010). L'activité de mTORC1 est régulée par de nombreux signaux impliquant des facteurs de croissance, des acides aminés, le glucose, le statut énergétique de la cellule et différentes formes de stress (Ravikumar *et al.*, 2010) (Fig. 1.10). Ainsi par exemple, l'AMP kinase, qui est un détecteur très conservé du niveau énergétique des cellules, favorise l'autophagie en phosphorylant les facteurs

de sclérose tubéreuse 1 et 2 (TSC 1 et 2), qui sont des inhibiteurs de mTOR (Jung *et al.*, 2010). Par ailleurs, la rapamycine, un antibiotique lipophile capable d'inhiber l'activité kinase de mTOR, est un activateur de l'autophagie (Ravikumar *et al.*, 2006).

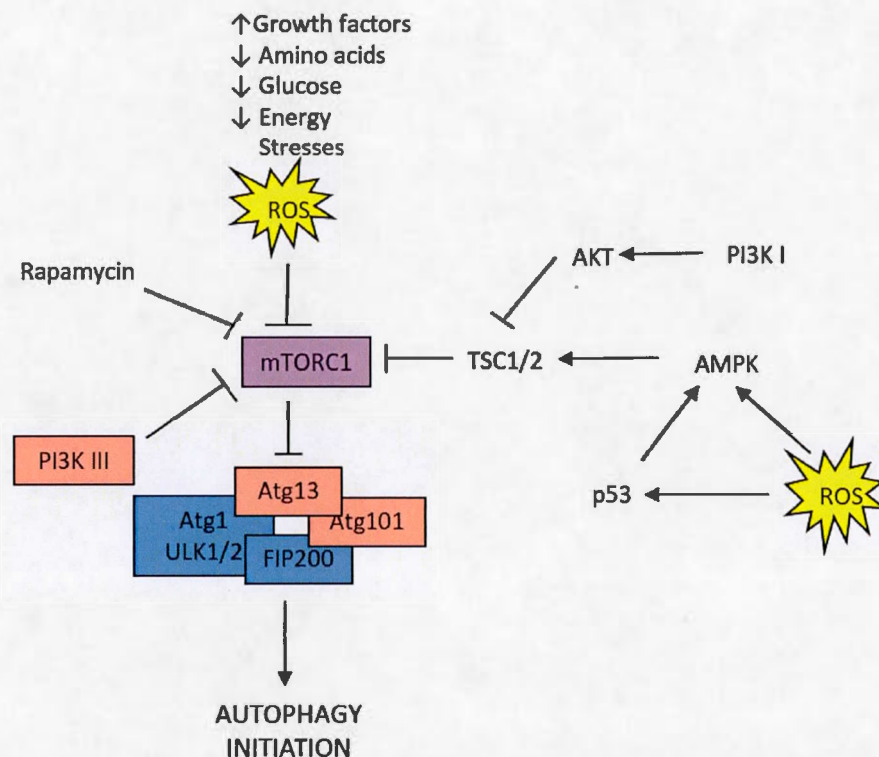


Fig. 1.10 : Régulation de l'autophagie par l'intermédiaire de mTOR.

mTORC1 régule l'autophagie en inhibant le complexe Atg1/Atg13/Atg101/FIP200. mTORC1 est inhibé par le complexe PI3K III, par la rapamycine, par les stress et par TSC1/2. TSC1/2 est activé par AMPK, lui-même activé par les ERO (ROS) et p53, tandis qu'il est inhibé par AKT.

Le complexe Atg1/ULK, sous contrôle de mTORC1, joue un rôle clef dans l'induction de l'autophagie. Il est constitué, chez les mammifères, de l'homologue de Atg1, soit ULK1 ou 2 (« Unc-51-like kinase 1 ou 2 »), de l'homologue de Atg13, de l'homologue de Atg17, de FIP200 (ou RB1CC1 « Rb1-inducible coiled-coil ») et de Atg 101 (Chen et Klionsky, 2011; Tanida, 2011). En conditions normales, mTORC1 interagit avec ce complexe, phosphoryle ULK1, inhibant son activité kinase, et hyperphosphoryle Atg13, ce qui conduit à l'inhibition de l'autophagie. En condition de stress, mTORC1 est inactif et se dissocie du complexe, ce qui conduit à la déphosphorylation et à l'activation de ULK1/2, qui phosphoryle ensuite Atg13, FIP200 et lui-même, et signe l'initiation de l'autophagie (Kroemer *et al.*, 2010; Mizushima, 2010).

La voie des complexes phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) est également sous contrôle de mTORC1 (Jung *et al.*, 2010). Les complexes PI3K de classe I et III sont respectivement des régulateurs négatif et positif de l'autophagie (Glick *et al.*, 2010). Lorsque des facteurs de croissance ou de l'insuline se fixent à des récepteurs à la surface de la cellule, PI3K I est activé et convertit les phosphatidylinositol-3,4-biphosphate (PIP2) de la membrane plasmique en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), ce qui entraîne le recrutement d'autres protéines inhibant l'autophagie. Par exemple, l'augmentation de PIP3 active AKT, ce qui entraîne l'inhibition de l'autophagie via l'activation de mTOR, par phosphorylation directe et/ou par phosphorylation et inactivation de TSC 1 et 2. En revanche, l'activation de PI3K III, à l'origine de la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), est une étape essentielle à la nucléation vésiculaire marquant le début du processus autophagique (Chen et Klionsky, 2011; He et Levine, 2010). Chez l'homme, ce complexe de classe III est constitué de l'homologue d'Atg6, soit Beclin 1, et des sous unités régulatrices Vps 34 et Vps15. En interagissant avec le complexe PI3K III, de nombreuses protéines régulent l'autophagie (Fig. 1.11). Ainsi, « UV radiation resistance associated gene » (UVRAG), « Activating molecule in beclin-1 regulated

autophagy » (AMBRA1), Atg14 et « Bax-interacting factor 1 » (Bif-1) induisent l'autophagie tandis que rubicon, Bcl-2 et Bcl-X_L inhibent ce processus (He et Levine, 2010).

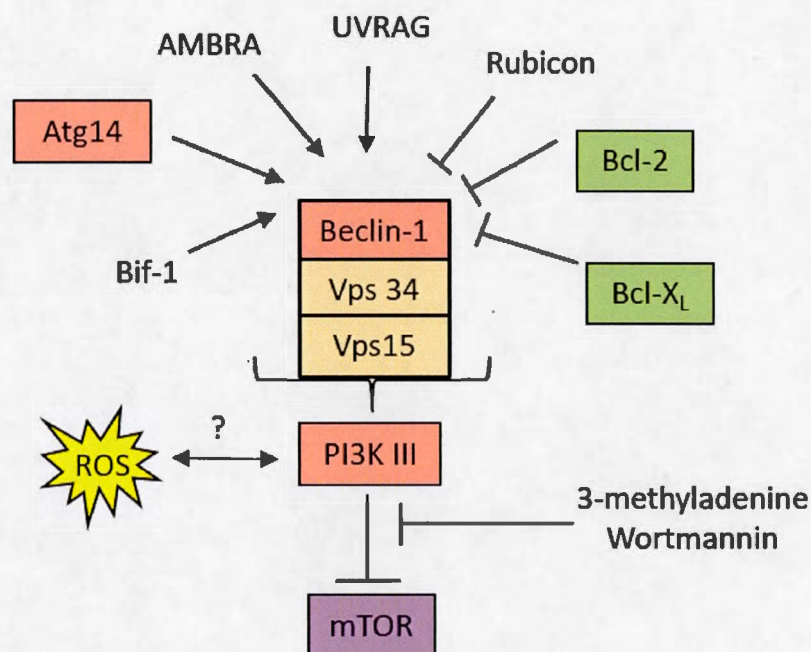


Fig. 1.11 : Régulation de l'autophagie par l'intermédiaire de la voie PI3K III/mTOR

Le complexe PI3K III est constitué de Beclin-1, de Vps 34 et de Vps 15. Il est activé par Bif-1, Atg14, AMBRA, UVRAG, et inhibé par Rubicon, Bcl-2 et Bcl-x_L. PI3K III inhibe mTOR et est inhibé par la 3-méthyladénine et la Wortmanine.

Par ailleurs, l'élongation et la complétion de la membrane du futur autophagosome nécessite deux systèmes de conjugaison ubiquitine-like (Tanida, 2011) (Fig. 1.12). Dans le premier complexe, Atg12 est conjugué à Atg5 par l'activité combinée d'Atg7 et Atg10. Le dimère Atg5-Atg12 forme ensuite un conjugué avec Atg16L, et ce trimère s'associe en quatre sous unités. Ce complexe est essentiel à l'élongation et se dissocie lorsque la vésicule est complète. Dans le second système,

l'homologue d'Atg8 chez les mammifères, soit LC3, est synthétisé sous forme de précurseur puis clivé par Atg4B, ce qui révèle un résidu glycine essentiel à sa future fonction. La protéine est alors sous la forme cytosolique non conjuguée LC3-I. Cette forme peut être conjuguée à un phosphatidyléthanolamine (PE) dans une réaction catalysée par Atg7 et Atg3, et dans laquelle le système Atg5-Atg12 pourrait intervenir. Le conjugué LC3-PE formé, également connu sous le nom LC3-II, est adressé vers la membrane de l'autophagosome en élongation, et demeure au niveau de cette membrane jusqu'à la fusion de l'autophagosome avec un lysosome. À ce moment, la liaison LC3-PE est clivée par Atg4 et LC3 est recyclé (Chen et Klionsky, 2011; Glick *et al.*, 2010).

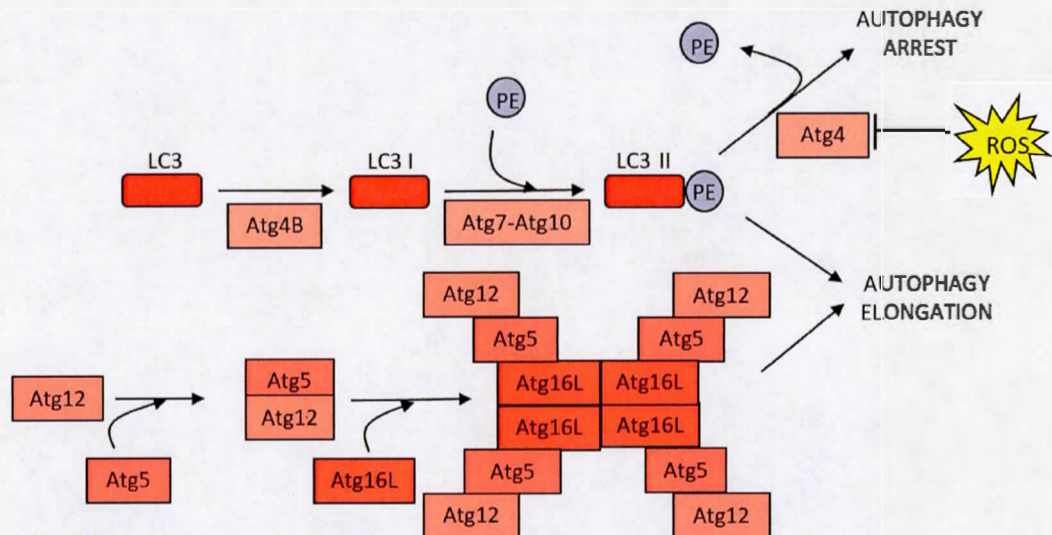


Fig. 1.12 : Régulation de l'autophagie par l'intermédiaire des complexes Atg5-Atg12-Atg16L et LC3-PE.

Deux complexes régulent l'élongation de l'autophagosome : le complexe Atg12/Atg5/Atg16L et le complexe LC3-PE. Alors que le premier complexe reste associé à la vésicule de façon très transitoire, LC3 demeure associé jusqu'à ce qu'Atg4, dont l'activité est régulée par les ERO (ROS), clive sa liaison avec le PE. Adapté de (Ravikumar *et al.*, 2009).

1.4.3 Autophagie et stress oxydatif

Il est généralement accepté que les ERO induisent l'autophagie et que l'autophagie réduit les dommages oxydatifs. L'accumulation de protéines oxydées au sein des cellules âgées ou atteintes des syndromes de Parkinson ou Alzheimer, dans lesquelles l'autophagie n'est pas ou peu fonctionnelle, témoigne de l'importance de l'autophagie dans la réponse au stress oxydatif (Scherz-Shouval et Elazar, 2011).

D'après les nombreuses études rapportant l'activation de l'autophagie en réponse au stress oxydatif, deux principales ERO seraient impliquées : H_2O_2 and $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Azad *et al.*, 2009). Le peroxyde d'hydrogène semble un bon candidat pour déclencher l'autophagie car c'est une molécule courante dans la signalisation du fait de sa stabilité relative par rapport aux autres ERO et de sa neutralité électrochimique, qui lui permet de traverser la membrane mitochondriale. Lorsque les cellules font face à un manque de nutriment, leur niveau d'ERO intracellulaire et particulièrement leur niveau de H_2O_2 mitochondrial augmente selon un mécanisme qui pourrait impliquer PI3K III, et cette augmentation est essentielle pour l'activation de l'autophagie (Scherz-Shouval et Elazar, 2007) (Fig. 1.10). Dans ces conditions, l'autophagie pourrait être induite du fait de la capacité du H_2O_2 à oxyder un résidu cystéine spécifique présent à la surface d'Atg4, conduisant à son inhibition (Scherz-Shouval *et al.*, 2007a; Scherz-Shouval *et al.*, 2007b) (Fig. 1.11). Ainsi, Atg4 n'est plus capable de cliver le lien LC3-PE permettant le recyclage de LC3 en fin de processus autophagique, ce qui pourrait conduire au maintien de l'activation de l'autophagie. En revanche, en conditions réductrices, Atg4 est actif et induit le clivage de LC3-PE et le recyclage de ses deux composants. Les ERO impliquées dans cette régulation pourraient provenir des mitochondries. D'autres stimuli adverses tels que l'hypoxie ou certaines drogues comme la méthamphétamine génèrent également du stress oxydatif et activent l'autophagie. La capacité du H_2O_2 à oxyder Atg4 pourrait être clef dans ces conditions également. Les ERO impliquées dans la régulation d'Atg4 pourraient provenir des

mitochondries. En effet, divers stress pourraient endommager les mitochondries, conduisant à une production d'ERO plus importante, générant un environnement pro-oxydant dans lequel H_2O_2 pourrait modifier Atg4 par oxydation, favorisant l'activation de l'autophagie (Scherz-Shouval *et al.*, 2007b). Les ERO produites par les mitochondries pourraient également induire la déphosphorylation de mTOR (Fig. 1.9), dans un mécanisme dépendant de « Bcl-2/E1B interacting protein 3 » (BNIP3) ou en inhibant la « Phosphatase and tensin homolog » PTEN, qui inhibe ensuite la voie PI3K-AKT-mTOR (Chen et Gibson, 2008; Li *et al.*, 2011b).

Cependant, dans certains cas tels qu'un manque de nutriment prolongé ou un traitement au sodium sélénite, un médicament anti-cancéreux alternatif, il est observé que la surexpression de SOD (convertissant $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2) conduit à l'inhibition de l'autophagie, tandis que la catalase (neutralisant le H_2O_2 en H_2O) n'induit pas cet effet (Chen *et al.*, 2009). De plus, une exposition prolongée au H_2O_2 (24h) conduit à l'endommagement des mitochondries, à la perturbation de la chaîne de transfert d'électrons, et conduit à l'accumulation de $O_2^{\cdot -}$ plutôt que de H_2O_2 , ce qui suggère que $O_2^{\cdot -}$ pourrait induire l'autophagie (Scherz-Shouval et Elazar, 2011).

1.4.4 Implication de l'autophagie dans la survie ou la mort cellulaire

Dans des conditions normales, l'autophagie est un processus impliqué dans le développement, la sénescence et l'immunité. Ce mécanisme participe au recyclage des constituants cellulaires, qui est essentiel au maintien de l'homéostasie (Marino *et al.*, 2011). De plus, l'autophagie est activée par de nombreux agents stressants tels que des produits chimiques comme la rapamycine, des pro-oxydants comme le peroxyde d'hydrogène, ou encore par le manque de nutriments ou d'oxygène (Codogno et Meijer, 2005). Dans ces configurations, l'autophagie permet la dégradation et le recyclage des constituants cellulaires, puis leur réutilisation par la cellule pour produire, par exemple,

de l'énergie ou de nouvelles protéines. De plus, l'autophagie permet l'élimination des constituants cellulaires endommagés par les stress, tels que les mitochondries, ainsi que leur renouvellement (Lemasters, 2005). Enfin, lors d'une exposition à un stress dénaturant, tel que le stress oxydatif, les protéines oxydées et potentiellement agrégées peuvent être dégradées par autophagie. Pour ces raisons, l'autophagie apparaît comme un mécanisme protecteur, favorisant la survie cellulaire, en conditions normales ou de stress (Levine et Kroemer, 2008).

Cependant, certaines études proposent que l'autophagie pourrait conduire à l'induction d'une mort cellulaire particulière, différente de l'apoptose ou de la nécrose, qualifiée de mort cellulaire par autophagie (Gozuacik et Kimchi, 2004). Cette hypothèse est apparue suite à l'observation d'une accumulation de vacuoles de type autophagosome au sein de cellules entrées dans un processus de mort, qui serait ainsi une caractéristique morphologique de cette voie (Shen et Codogno, 2011). D'après certains chercheurs, l'autophagie pourrait être responsable d'une dégradation excessive de constituants cellulaires, tels que les mitochondries ou encore la catalase conduisant à l'installation du stress oxydatif et induisant la mort cellulaire (Yu *et al.*, 2006). Si certains exemples de mort cellulaire par autophagie sont effectivement observés et répondent au triple critère i) d'indépendance vis-à-vis de l'apoptose, ii) d'inhibition par des inhibiteurs de l'autophagie et iii) de corrélation avec une augmentation du flux autophagique, ces études concernent la plupart du temps des eucaryotes inférieurs tels que la drosophile (Baehrecke, 2003) ou des cellules de mammifères cultivées *in vitro* dans des conditions où l'apoptose est inhibée (Fulda, 2012). De plus, dans de nombreux cas chez les mammifères, l'inhibition de l'autophagie ne conduit pas à un sauvetage des cellules de la mort, mais à une accélération des processus de mort. Ces faits conduisent certains scientifiques à suggérer que chez les mammifères, la mort cellulaire par autophagie pourrait être un artefact. Les cellules pourraient en effet mourir *avec* l'activation de l'autophagie, mais pas nécessairement *par* l'activation de l'autophagie (Shen *et al.*, 2012).

Le manque de caractérisation d'une éventuelle mort cellulaire par autophagie chez les mammifères rend délicate la classification de l'autophagie en tant que réponse de survie ou de mort (Levine et Yuan, 2005). Néanmoins, l'autophagie pourrait intervenir comme mécanisme de survie ou de mort cellulaire, dépendamment de l'organisme étudié, de la nature du stimulus adverse et de la dose de stress reçue (Lee *et al.*, 2012).

1.5 Présentation du projet

1.5.1 Introduction

L'élucidation des mécanismes impliqués dans la toxicité des xénobiotiques est cruciale pour la mise en place de stratégies de protection des êtres vivants vis à vis de leurs effets délétères. Or de nombreux toxiques génèrent du stress oxydatif, qui pourrait être responsable de leur nocivité. Aussi, l'appréhension des mécanismes de toxicité induits par de nombreux facteurs nécessite une amélioration de la compréhension des réponses élicitées par le stress oxydatif. Ce stress induit des voies de signalisation d'une façon dépendante de la dose et du temps d'exposition.

Au sein des cellules de carcinome cervical humain HeLa, il a été mis en évidence que de faibles doses de peroxyde d'hydrogène entraînent l'activation de protéines de défense du RE, tandis que de fortes doses induisent l'apoptose ou la nécrose (Pallepati et Averill-Bates, 2010; Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b). L'autophagie pourrait promouvoir la survie ou bien la mort cellulaire, dépendamment des conditions. Il convient de déterminer tout d'abord quelles doses de H₂O₂ activent l'autophagie puis d'évaluer si cette activation constitue une réponse de survie ou de mort en étudiant de quelle manière le profil d'induction de l'apoptose par le stress oxydatif est modulé lorsque l'autophagie est inhibée.

De plus, il a été montré que la thermotolérance permettait de protéger les cellules contre l'apoptose induite par le stress oxydatif, et ce *via* les trois voies d'activation de l'apoptose : mitochondrie (Pallepati et Averill-Bates, 2010), récepteurs de mort (Pallepati et Averill-Bates, 2011b) et RE (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Cette protection est acquise par l'induction de systèmes de défenses impliquant des protéines de choc thermique (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008, 2015), des facteurs antioxydants (Pallepati et Averill-Bates, 2010), anti-apoptotiques (Glory *et al.*, 2014; Pallepati et Averill-Bates, 2011b) ainsi que des acteurs de la protection du RE (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). La thermotolérance pourrait potentiellement induire également l'autophagie. De plus, si la thermotolérance peut rendre les cellules moins sensibles à l'apoptose induite par le stress oxydatif, il convient de se demander si cette protection est toujours efficace lorsque l'autophagie est inhibée.

1.5.2 Hypothèses

Nous formulons les hypothèses suivantes :

- L'autophagie est activée par des doses de stress oxydatif relativement faibles, de l'ordre de celles activant des réponses de survie
- L'inhibition de l'autophagie, en tant que réponse de survie, augmente la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par le stress oxydatif
- La thermotolérance développée à 40°C peut induire l'autophagie en tant que réponse de survie
- L'induction de la thermotolérance diminue la sensibilité des cellules à l'apoptose déclenchée par le stress oxydatif lorsque l'autophagie est inhibée

1.5.3 Objectifs du projet

Les objectifs généraux du projet sont de déterminer les modalités d'induction de l'autophagie par le stress oxydatif et son implication dans l'activation de l'apoptose, ainsi que d'étudier si la thermotolérance peut d'une part activer l'autophagie et d'autre part maintenir son effet protecteur lorsque l'autophagie est inhibée.

Dans le but de valider ou d'infirmer les hypothèses précédemment énoncées, nous proposons les objectifs spécifiques suivants :

- 1) Étudier le profil d'activation de l'autophagie en fonction de la dose et du temps d'exposition au H_2O_2 , en le comparant à l'induction de l'apoptose par le H_2O_2 .
- 2) Évaluer les conséquences de l'inhibition de l'autophagie sur l'induction de l'apoptose par le stress oxydatif.
- 3) Observer l'impact de la thermotolérance sur l'activation de l'autophagie.
- 4) Déterminer si la thermotolérance peut protéger les cellules de l'apoptose induite par le H_2O_2 lorsque l'autophagie est inhibée.

1.5.4 Choix du modèle

La lignée cellulaire HeLa a été choisie comme modèle cellulaire. Ces cellules ont été isolées à partir d'un carcinome du col de l'utérus humain et ont été mises en culture pour la première fois en 1951. Depuis, cette lignée cellulaire est très couramment utilisée dans les laboratoires de recherche du fait de son caractère immortel et de sa prolifération rapide. La lignée cellulaire a été obtenue *via* « The American Type Culture Collection » (ATCC n° CCL-2). Elle a été choisie car les profils d'activation de la mort cellulaire par apoptose et nécrose en réponse au stress oxydatif (Pallepati et Averill-Bates, 2010; Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b) ont été étudiés en profondeur. De plus, l'efficacité de la thermotolérance comme mécanisme de protection envers l'apoptose induite par le stress oxydatif a été caractérisée avec ce type cellulaire.

En revanche, le profil d'activation de l'autophagie par le peroxyde d'hydrogène et ses relations avec l'activation de l'apoptose n'a pas reçu d'attention particulière au sein de cette lignée cellulaire, malgré l'existence de soupçons croissants concernant les liens entre activation de l'autophagie et de l'apoptose. De plus, aucune étude actuelle ne propose de lien entre acquisition de la thermotolérance et autophagie chez l'homme. Notre étude permet d'avancer les connaissances concernant les mécanismes impliqués dans la régulation de l'autophagie et de l'apoptose par le stress oxydatif et dans les conséquences de l'acquisition de la thermotolérance dans l'induction de ces deux voies.

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

2.1 Préface

Ce chapitre est constitué d'un article, construit à partir des résultats expérimentaux obtenus au cours du projet mené durant ma maîtrise au sein du laboratoire de la Dr Diana Averill. Cet article, intitulé « Inhibition of autophagy sensitizes cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis: protective effect of mild thermotolerance acquired at 40°C », sera soumis au journal « Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research ». En tant que première auteure, j'ai réalisé la majorité des expérimentations relatives à cette étude, la mise en forme de l'article et des figures, les statistiques, la rédaction de l'article et les recherches bibliographiques. Hou Ve, second auteur, a réalisé les expérimentations concernant les caspases-8, -4, -7 et la calpaine. Enfin Dr Diana Averill a été à l'origine du concept du projet, a réalisé des recherches bibliographiques relatives à l'étude et a révisé l'article.

2.2 Article

INHIBITION OF AUTOPHAGY SENSITIZES CELLS TO HYDROGEN PEROXIDE-INDUCED APOPTOSIS: PROTECTIVE EFFECT OF MILD THERMOTOLERANCE ACQUIRED AT 40°C

Maureen Redza-Dutordoir, Hou Ve and Diana A. Averill-Bates*

Département des sciences biologiques (TOXEN), Université du Québec À Montréal, Montréal, Québec, Canada

* Corresponding author:

Dr Diana A. Averill-Bates

Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal

CP 8888, Succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3P8

Tel: (514) 987-3000 (4811); Fax: (514) 987-4647; Email: averill.diana@uqam.ca

Keywords: oxidative stress, thermotolerance, hormesis, caspases, autophagy

Highlights:

- Low dose oxidative stress activates autophagy as a survival response.
- Protective effect of mild thermotolerance is in part mediated by autophagy induction.
- Autophagy disruption activates the three major pathways of apoptosis.

Abbreviations:

3-MA : 3-methyladenine; AFC : 7-Amino-4-trifluoromethylcoumarin; AMC : 7-Amino-4-methylcoumarin; AMPK : AMP-activated protein kinase; Apaf-1 : Apoptotic Peptidase Activating Factor 1; ATF6 : Activating Transcription Factor 6; Atg : Autophagy related genes; Baf : Bafilomycin A1; Bcl-2 : B-cell-lymphoma protein 2; BSA : Bovine Serum Albumin; Ca^{2+} : Calcium (II); CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate; CO_2 : Carbone dioxide; DEVD : Asp-Glu-Val-Asp; DISC : Death Inducing Signaling Complex; DMEM : Dulbecco Modified Eagle's Medium; DNP : 2,4-dinitrophenol; DTT : Dithiothreitol; eIF2 α : eukaryotic initiation factor 2; EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA : Ethylene glycol tetraacetic acid; EITD : Ile-Glu-Thr-Asp; ER : Endoplasmic reticulum; FADD : Fas-associated Death Domain; FBS : Fetal Bovine Serum; GAPDH : Glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogenase; H_2O_2 : Hydrogen peroxide; $\cdot\text{OH}$: Hydroxyl radical; HSP : Heat Shock Protein; ICAD : Inhibitor of Caspase Activated DNase; Inh. : Inhibitor; IRE-1 α : serine/threonine-Protein Kinase/endoribonuclease; JNK : c-Jun N-terminal kinase; LEHD : Leu-Glu-His-Asp; LEVH : Leu-Glu-Val-Asp; MCA : methoxycoumarin-acetyl; MOPS : 3-morpholinopropane-1 sulfonic acid; mTORC1 : mammalian Target of Rapamycine Complex 1; N : Non thermotolerant cells; NF- κB : Nuclear Factor kappa-B; $\text{O}_2^{\cdot-}$: Superoxide anion; PARP : Poly-(ADP-ribose) polymerase; PBS : Phosphate buffered saline; PERK : Protein kinase RNA-like ER kinase; PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase; PIPES : 1,4-Piperazinediethanesulfonic acid; PMSF : Phenylmethylsulfonyl; ROS : Reactive Oxygen Species; SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate -Polyacrylamide gel electrophoresis; Suc-LY : Suc-Leu-Tyr; TSC 1/2 : Tuberous Sclerosis Factor 1 or 2; TT : Thermotolerant cells; UPR : Unfolded Protein Response; XBP1 : X-Box Binding Protein.

2.2.1 Abstract

Various toxic compounds and stressful environmental conditions produce reactive oxygen species (ROS), resulting in oxidative stress that threatens homeostasis. Yet, lower doses of stress stimulate defense systems allowing cell survival, whereas intense stress activates cell death pathways such as apoptosis. Furthermore, mild thermal stress (40°C, 3 h) induces thermotolerance, an adaptive survival response that renders cells less sensitive to subsequent toxic stress, by activating defense systems like heat shock proteins, antioxidants, anti-apoptotic and ER-stress factors. This study aims to understand how autophagy and apoptosis are regulated in response to different doses of H₂O₂, and whether mild thermotolerance protects cells against apoptosis by stimulating autophagy. Autophagy was monitored through Beclin-1 and LC3 expression and acid compartment activity, whereas apoptosis was tracked by caspase activity and chromatin condensation. Lower doses (50 µM, 15-30 min) of H₂O₂ transiently induced autophagy in HeLa cells, whereas higher doses (50 µM, 1-3 h) activated apoptosis. Mild thermotolerance enhanced activation of autophagy by lower doses of H₂O₂. Disruption of autophagy using bafilomycin A1 and 3-methyladenine sensitized cells to apoptosis induced by higher doses of H₂O₂, in non-thermotolerant cells and, to a lesser extent, in thermotolerant cells. Inhibition of autophagy enhanced apoptosis through the mitochondrial, death receptor and endoplasmic reticulum pathways. Therefore, autophagy is activated by lower doses of stresses and protects cells against the induction of apoptosis by higher doses of H₂O₂. This work improves understanding of mechanisms that might be involved in toxicity of various compounds, and could eventually lead to protective strategies against deleterious effects of toxic compounds.

Key words: oxidative stress, thermotolerance, hormesis, caspases, autophagy

2.2.2 Résumé

De nombreux composés toxiques et facteurs environnementaux produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO), pouvant conduire à l'apparition d'un stress oxydatif menaçant l'homéostasie cellulaire. Or de faibles doses de stress stimulent des systèmes de défense favorisant la survie des cellules, tandis qu'un stress plus intense active des voies de mort comme l'apoptose. Par ailleurs, un stress thermique faible (40°C, 3 h) induit la thermotolérance, une réponse adaptative de survie permettant aux cellules d'être moins sensibles lors de l'exposition à un stress toxique subséquent, par l'activation de systèmes de défenses tels que les protéines de choc thermique, anti-apoptotiques, antioxydantes et de défense du RE. Cette étude a pour but de comprendre comment l'autophagie et l'apoptose sont régulés en réponse à différentes doses de H₂O₂, et si la thermotolérance (40°C) protège les cellules contre l'apoptose en induisant l'autophagie. L'expression de Beclin-1 et LC3 ainsi que le niveau d'organelles acides ont été utilisés comme marqueurs de l'autophagie, tandis que l'apoptose a été mesurée par la condensation de la chromatine et l'activité des caspases. De faibles doses de H₂O₂ (50 µM, 15-30 min) activent transitoirement l'autophagie au sein des cellules HeLa tandis que de plus fortes doses (50 µM, 1-3 h) induisent l'apoptose. De plus, la thermotolérance (40°C) augmente l'activation de l'autophagie par de faibles doses de H₂O₂. L'inhibition de l'autophagie par la bafilomycine A1 ou la 3-méthyladenine sensibilise les cellules à l'apoptose induite par de fortes doses de H₂O₂, au sein des cellules non-thermotolérantes et thermotolérantes. L'inhibition de l'autophagie augmente l'induction de l'apoptose par les voies mitochondriale, des récepteurs de mort et du réticulum endoplasmique. Ainsi, l'autophagie est activée par de faibles doses de stress, et protège contre l'induction de l'apoptose par de fortes doses de H₂O₂. Ce travail améliore notre compréhension des mécanismes qui pourraient être impliqués dans la toxicité de nombreuses substances et pourrait permettre le développement de stratégies de protection contre leurs effets néfastes.

Mots clefs: stress oxydatif, thermotolérance, hormèse, caspases, autophagie

2.2.3 Introduction

Reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H_2O_2), superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and the hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), can be generated as by-products of metabolism, or by exposure to stresses like UV and ionizing radiations (Leach *et al.*, 2001), tobacco smoke (Jaimes *et al.*, 2004), heavy metals (Liu *et al.*, 2009) and chemotherapeutic pharmaceuticals (Franco et Panayiotidis, 2009). At low levels, ROS intervene in the regulation of cellular functions such as proliferation, growth and differentiation (Dickinson et Chang, 2011). However, at higher levels, their oxidative potential is a threat to cellular redox homeostasis. Therefore, ROS levels are tightly regulated by the antioxidant system composed of both enzymatic (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, etc.) and non-enzymatic (vitamin E, C, carotenoids, glutathione, etc.) molecules (Pisoschi et Pop, 2015). When the antioxidant system is overwhelmed, a redox imbalance known as oxidative stress occurs, and excess levels of ROS can then target DNA, proteins and lipids, resulting in senescence or cell death, possibly through apoptosis (Franco *et al.*, 2009).

Apoptosis is a cell death process that is characterised by cell shrinking, chromatin condensation, formation of apoptotic bodies and the subsequent digestion of cellular fragments by macrophages (Hacker, 2000). Most of the pathways leading to apoptosis involve the activation of a cascade of cysteine-dependant proteases named caspases. Apoptotic caspases comprise initiators, such as caspases-8, -9 and 4/12, and effectors, like caspases-3, -6 and -7. Caspases are synthesised as inactive zymogens, which are recruited to complexes where they are processed and activated after a death stimulus (Salvesen et Riedl, 2008). Active caspases recognize a specific amino acid sequence on their targets and hydrolyse a peptide bond at the carboxyl end of an aspartate residue. Caspase substrates, beyond other caspases, include structural proteins, such as actin, lamin A, gelsolin and fodrin; proteins involved in DNA repair, like the poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) and cell cycle-related proteins such as

p53 and Inhibitor of Caspase Activated DNase (ICAD) (Pallepati et Averill-Bates, 2012). The cleavage of these substrates induces the morphological characteristics of apoptosis and dismantlement of the cell (Wyllie, 2010).

Caspase-mediated apoptosis can be triggered by three main pathways. For example, after mitochondrial permeabilization induced by a toxic stress and involving the B-cell-lymphoma protein 2 (Bcl-2) family of proteins, procaspase-9 is recruited to an apoptosome complex, along with the Apoptotic Peptidase Activating Factor 1 (Apaf-1) and cytochrome c, leading to procaspase-9 cleavage and activation (Wurstle *et al.*, 2012). Moreover, following the binding of death ligands to a death receptor, procaspase-8/10 is recruited and processed in a complex named the Death Inducing Signaling Complex (DISC) and involving the Fas-associated Death Domain (FADD) (Pennarun *et al.*, 2010). Both caspase-9 and -8/10 can subsequently activate effector caspases such as caspases-3/6/7, triggering apoptosis. Caspase-8 can also activate caspase-2 and cleave proteins involved in mitochondrial permeabilization such as Bid (Kantari et Walczak, 2011), leading indirectly to caspase-9 activation. Furthermore, endoplasmic reticulum (ER) stress can trigger apoptosis by activating procaspase-12/4, causing caspase-9 processing (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Procaspase-12/4 cleavage could involve m-calpain, after its activation by high calcium efflux from the ER (Tan *et al.*, 2006), or caspase-7 (Rao *et al.*, 2001). The involvement of caspases in these different pathways makes them key players of apoptosis.

Macroautophagy, usually and herein referred to as autophagy, is another process which can be activated by oxidative stress (Azad *et al.*, 2009). During this highly conserved catabolic pathway, a vesicle englobing damaged cellular material and named autophagosome is assembled, and then targeted to acidic compartments, leading to degradation of its content. The mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) is one of the key proteins participating in the regulation of autophagy. It inhibits autophagy, notably by phosphorylating proteins from the autophagy related

family (Atg) (Jung *et al.*, 2010). Atg6, also known as Beclin-1, intervenes early in autophagy regulation through its association with Vps34 and Vps15 in the class III Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) complex, which inhibits mTORC1, therefore promoting autophagy (He et Levine, 2010). Atg8, also known as LC3, is a key operator in autophagosome elongation and completion. LC3 conjugates with a phosphatidylethanolamine of the autophagosome membrane and is therefore considered a good marker of autophagy (Chen et Klionsky, 2011). Autophagy enables cells to eliminate damaged material, during normal function as well as in response to stress. However, it is not always clear whether the induction of autophagy in response to stress consists of a survival or a death response. Therefore, the synergic or antagonistic nature of the interactions between autophagy and apoptosis is not well understood (Shen et Codogno, 2011).

Several defense systems enable cells to resist oxidative stress-triggered apoptosis. As an example, transient exposure of cells to sub-lethal temperatures (ex: 40°C, 3 h) induces a transitory adaptive response called thermotolerance, which allows cells to survive when subsequently exposed to a potentially lethal stress, including thermal stress, oxidative stress, ionizing radiation or environmental toxins (Martindale et Holbrook, 2002; Przybytkowski *et al.*, 1986). The acquisition of thermotolerance at 40°C has been associated with changes in the expression of genes and proteins taking part in various defense systems, such as heat shock proteins (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008), antioxidants (Pallepati et Averill-Bates, 2010), anti-apoptotic proteins (Glory *et al.*, 2014) and ER-associated defenses (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Pallepati et Averill-Bates, 2011a). These protective factors allow thermotolerant cells to better endure subsequent stresses (Portt *et al.*, 2011), such as heat shock (Bettaieb et Averill-Bates, 2005) and oxidative stress (Pallepati et Averill-Bates, 2010; Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b). Because autophagy can be considered as a survival response, it would be of interest to determine if it can be activated as a result of thermotolerance acquisition.

The aims of this study are to verify if autophagy is activated in response to different doses of hydrogen peroxide, and the consequences of autophagy inhibition on the induction of apoptosis by hydrogen peroxide. This study will determine whether autophagy inhibition leads to induction of apoptosis and characterize the pathways that are involved. Furthermore, this study aims to determine if mild thermotolerance induced at 40°C can trigger autophagy as a survival response, and whether thermotolerance can protect cells from oxidative stress when autophagy is impaired. The results from this study should improve understanding of the links between autophagy and apoptosis when cells are exposed to oxidative stress.

2.2.4 Materials and Methods

Cell culture

HeLa cells (ATCC # CCL-2) were grown in monolayer in tissue culture flasks (Sarstedt, St Laurent, QC, Canada) in modified Eagle's Dulbecco medium (DMEM) (Invitrogen Canada, Burlington, ON, Canada) containing 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Canada), penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Flow Laboratories, Mississauga, ON), in a water jacketed incubator at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. To induce thermotolerance, cells were transferred to an identical incubator for 3 h at 40°C, following a period of 20 min to allow the temperature of the culture medium to reach 40°C (Glory *et al.*, 2014). Cell culture medium was replaced with fresh medium 24 h before experiments. Cells were grown to near confluence and then harvested using 0.5 mg/ml trypsin/0.2 mg/ml EDTA in phosphate buffered saline (PBS) and washed by centrifugation (1000 x g, 3 min).

Treatment with H₂O₂ and activators/inhibitors

Freshly harvested non-thermotolerant and thermotolerant HeLa cells were resuspended in DMEM/10% FBS at 1×10^6 cells/ml in a final volume of 1 ml, and then incubated in a water jacketed incubator at 37°C in a humidified atmosphere with 5%

CO₂. Cells were treated with 0 to 100 μ M H₂O₂, either with or without bafilomycin A1 (1 μ M) (Bowman *et al.*, 1988) or 3-methyladenine (1 mM) (Seglen et Gordon, 1981) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Cells were also exposed to H₂O₂ (0 or 50 μ M) for 2 h in presence or absence of caspase-9 inhibitor (Z-LEHD-FMK, 20 μ M) or calpain inhibitor (Ac-LLnL-CHO, 20 μ M). Finally, cells were treated with rapamycin (0, 1, 5 μ M) for 3 h to induce autophagy as a positive control (Thoreen et Sabatini, 2009). Cells were then washed by centrifugation (1000 x g, 3 min) to remove chemicals, and then analysed for levels of acidic vesicles, LC3 immunofluorescence, Beclin-1 expression, chromatin condensation, and caspase and calpain activity.

Fluorescence microscopy analysis of autophagy

To analyse levels of acidic vesicles, cells were suspended in PBS containing 50 nM LysoTracker Red DND 99 (Life technologies Inc., ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and incubated for 30 min at 37°C. To analyse LC3 immunofluorescence, cells were fixed using 3.7% formaldehyde during 15 min. Cells were washed 3 times with PBS and then incubated overnight with primary antibody against LC3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) (1:50) in PBS/5% bovine serum albumin (BSA)/5% normal goat serum/0.3% Triton X-100. Cells were then washed 3 times with PBS and incubated with Alexa-488-conjugated anti-rabbit antibody (Life technologies Inc.) for 2 h, and then washed 3 times with PBS. Observations were made by fluorescence microscopy (model Eclipse Ti 3000 inverted microscope, Nikon, Montréal, QC, Canada) and photographs were taken by digital camera. Images were analysed using Image J software. Fluorescence intensities were reported to the number of cells and compared between treated and untreated samples.

Beclin-1 expression

Cells were washed by centrifugation (1000 x g, 3 min) in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM EGTA, 20 mM MOPS, pH 7.4) (Samali *et al.*, 1999). The supernatant

was discarded and cells were resuspended in lysis buffer (20 mM MOPS, 80 mM β -glycerol phosphate, 5 mM EGTA, 1 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , 20 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM NaF, 1 mM dithiothreitol (DTT), 10% glycerol, 1% Triton X-100, pH 7, and a cocktail of protease inhibitors : 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10 mM aprotinin, 10 mM pepstatin A, 10 mM leupeptin, 25 mM calpain inhibitor I, pH 7.4) and incubated on ice for 1 h (Bettaieb et Averill-Bates, 2008). Whole cell lysates were isolated in the supernatant by a 10 min centrifugation (2500 x g) to remove nuclei and unbroken cells. Proteins were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (12%) and detected by Western blotting using primary antibody against Beclin-1 (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish-conjugated polyclonal secondary antibody (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology). Protein expression was analysed relative to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) using a laser scanning densitometer (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA) and Fluorchem and Quantity One software.

Morphological analysis of apoptosis

Cells were labeled with Hoechst 33258 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, MO, USA) at 37°C during 15 min. Observations were made by fluorescence microscopy (model Eclipse Ti 3000 inverted microscope, Nikon) and photographs were taken with a digital camera (Glory *et al.*, 2014). Images were analysed using Image J software. Cells presenting highly-condensed chromatin were counted and reported to the total number of cells, and treated samples were compared to untreated controls.

Caspase and calpain activity

Cells were suspended in caspase buffer (10% sucrose, 0.1% CHAPS, 20 mM PIPES, 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.2) and frozen at -80°C overnight. Cell lysates were then incubated with the appropriate substrate: Ac-DEVD-

AMC for caspase-3, Ac-LEHD-AFC for caspase-9, MCA-Val-Asp-Gln-Val-Gly-Trp-Lys-(DNP)-NH₂ for caspase-7 (Cayman Chemical), Z-IETD-AFC for caspase-8, Ac-LEVD-AFC for caspase-4 and Suc-LY-AMC for calpain (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) activity (Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b). The kinetic reactions to generate amino-trifluoromethylcoumarin (AFC) (excitation 400 nm, emission 505 nm), amino-methylcoumarin (AMC) (excitation 380 nm, emission 460 nm) or methoxycoumarin-acetyl (MCA) (excitation 325 nm, emission 392 nm) were followed by spectrofluorometry (Infinite M1000 PRO, Tecan, San Jose, CA, USA).

Statistics

Data represent means \pm SEM from at least three independent experiments performed in duplicate. Comparisons among multiple groups were made by one-way or two-way ANOVA, which measures the linear contrast of means. The Bonferroni-Holmes adjustment was used to control for the family-wise error rate at a desired level ($\alpha=5\%$). The software used was GraphPad Prism5 (San Diego, CA, USA). For significant differences, $p < 0.05$.

2.2.5 Results

Low dose hydrogen peroxide transiently activates autophagy

The ability of hydrogen peroxide to activate autophagy, as a function of different doses, was investigated in HeLa cells. The induction of autophagy by H₂O₂ was first examined by fluorescence microscopy using LysoTracker red, an indicator of formation of acidic vesicular organelles, which correlate with increased autophagosomes, indicating formation of autolysosomes. Treatment of cells with H₂O₂ (10-100 μ M) during 15, 30 or 60 min transiently activated autophagy in a dose and time-dependant manner (Fig. 2.1A). After 15 min, levels of acidic lysosomal organelles increased with concentration from 25 μ M to 90 μ M H₂O₂, reaching a maximum 30% increase at 75 μ M H₂O₂, and returned to control levels at 100 μ M H₂O₂. When cells

were treated for 30 min, a lower H₂O₂ concentration of 10 μ M increased acidic organelles and a peak was observed at 50 μ M (40% increase) followed by a return to control levels at 90 μ M. No increase in acidic organelles was detected after exposure to H₂O₂ (10-100 μ M) for 60 min. This shows that, at higher H₂O₂ concentrations, lower exposure times were required to induce the same level of autophagy (Fig 2.1A).

The suitability of using Lysotracker red to monitor autophagy was verified using a common activator of autophagy, rapamycin (Thoreen et Sabatini, 2009), and chemical inhibitors of autophagy, bafilomycin A1 (Baf) (Bowman *et al.*, 1988) or 3-methyladenine (3-MA) (Seglen et Gordon, 1981). Indeed, treatment of cells with 1 μ M or 5 μ M rapamycin during 3 h enhanced Lysotracker red fluorescence, and hence autophagy, by 40% relative to untreated control (Fig. 2.1B). When cells were treated with 50 μ M H₂O₂, the inhibitors Baf and 3-MA reduced the level of autophagy by about 80% and 50% respectively (Fig. 2.1C). These inhibitors also inhibited basal levels of autophagy in untreated control cells (0 μ M H₂O₂) (Fig. 2.1C). Together, these results confirm the formation of acidic vesicular organelles and the activation of autophagy.

The induction of autophagy by H₂O₂ was further investigated by measuring LC3 expression through immunofluorescence using an Alexa 488-coupled-LC3-targeted antibody. Treatment of HeLa cells with 50 μ M H₂O₂ during 15 or 30 min triggered an increase in levels of LC3 immunofluorescence, compared to untreated controls (Fig. 2.1D). No induction of LC3 occurred after a longer exposure time of 60 min. In addition, there was no change in LC3 expression at a higher dose of 100 μ M H₂O₂ (Fig. 2.1D). Autophagy was therefore activated transiently by shorter exposure times to lower (50 μ M) H₂O₂ concentrations.

Finally, activation of autophagy by lower doses (5-50 μ M) of H₂O₂ during 15, 30 or 60 min was examined using Beclin-1 expression in whole cell lysates (Fig 2.1E). Treatment of cells for 15 min with H₂O₂ concentrations ranging from 5 to 25 μ M triggered an increase in Beclin-1 expression whereas levels decreased at 50 μ M. After

a longer exposure time of 30 min, Beclin-1 expression increased from 10 to 50 μM . However, no change in Beclin-1 expression was detected after a longer time of 60 min to 50 μM H_2O_2 . Therefore, hydrogen peroxide increased Beclin-1 expression in a dose and time-dependant manner. However, for the same exposure time of 15 min, lower H_2O_2 concentrations were needed to increase Beclin-1 expression (Fig. 2.1E, peak at 25 μM H_2O_2) compared to LC3 expression (Fig. 2.1D, peak at 50 μM H_2O_2) or level of acidic vesicular organelles (Fig. 2.1A, peak at 90 μM H_2O_2). This can be explained by the fact that Beclin-1 activation is an early event of autophagy, whereas LC3 recruitment to autophagosomes and formation of acidic vesicular organelles are later events in the process (Glick *et al.*, 2010). Together these results support transient activation of autophagy following short exposures (15-30 min) to low concentrations of hydrogen peroxide (5-90 μM) and decrease in autophagy activation following longer exposures (30-60 min) to the same concentrations of hydrogen peroxide (5-90 μM).

Thermotolerance acquired at 40°C enhances activation of autophagy by hydrogen peroxide

Subsequently, we determined whether mild thermotolerance induced at 40°C during 3 h could trigger autophagy as a survival response in HeLa cells subjected to hydrogen peroxide. The expression of Beclin-1 was enhanced by 10 to 20% when cells were pre-conditioned for 3 h with 40°C (TT) and then exposed to low dose H_2O_2 (5-50 μM) for 15 min, compared to non-thermotolerant (N) cells (Fig. 2.2A). Beclin-1 expression was also higher in thermotolerant cells after exposure to 5 and 10 μM H_2O_2 for 30 min (Fig. 2.2B). There was a tendency for increased levels of Beclin-1 in untreated (0 μM H_2O_2) thermotolerant cells (Fig. 2.2A, 2.2B).

The induction of LC3 by H_2O_2 was subsequently compared in non-thermotolerant and thermotolerant (40°C) cells (Fig. 2.3). In thermotolerant (TT, 40°C) cells, levels of LC3 detected by immunofluorescence were 15 to 25% higher when cells were treated with 50 μM H_2O_2 for 15 min (Fig. 2.3A), 30 min (Fig 2.3B) and 60 min

(Fig 2.3C). Moreover, despite the lack of activation of autophagy by 100 μM H_2O_2 in non-thermotolerant cells after 15 to 60 min (Fig 2.3A-2.3C), preconditioned cells at 40°C exhibited an increase in LC3 expression and hence autophagy under these conditions. Therefore, autophagy was induced at higher levels and at higher H_2O_2 doses in thermotolerant cells compared to non-thermotolerant cells. There was also a small increase in LC3 levels in untreated (0 μM H_2O_2) thermotolerant cells (Fig. 2.3A-2.3C). Moreover, co-labelling of cells with LC3 and Lysotracker red emphasised that LC3 was co-localised with acidic vesicular organelles, suggesting that LC3 associated with autophagosomes after short exposure times to low dose H_2O_2 .

H_2O_2 -mediated activation of autophagy was also analysed in thermotolerant cells by detecting levels of acidic vesicular organelles using Lysotracker red (Fig. 2.4A-2.4C). There was a tendency for an increase in induction of autophagy by up to 20% in thermotolerant cells, compared to non-thermotolerant cells, when exposed to lower doses of H_2O_2 : 10-50 μM for 15 min (Fig. 2.4A) and 10-25 μM for 30 min (Fig. 2.4B). There was no difference for higher doses of H_2O_2 . Moreover, preconditioning of cells at 40°C shifted the peak induction of autophagy from 75 μM to 50 μM after 15 min exposure to H_2O_2 and from 50 μM to 25 μM after 30 min treatment with H_2O_2 . After 60 min exposure to 10-100 μM H_2O_2 , levels of acidic vesicular organelles were higher in thermotolerant cells, whereas they did not increase in controls (Fig. 2.4C). Acidic vesicular organelles were also higher in untreated (0 μM H_2O_2) thermotolerant cells (Fig. 2.4A-2.4C). Thus, thermotolerance (40°C) increases autophagy levels in response to lower concentrations and longer time of exposure to H_2O_2 than in non-thermotolerant cells. Together, these results show that acquisition of mild thermotolerance (40°C) increases the induction of autophagy, both in untreated cells and during exposure of cells to lower doses of hydrogen peroxide.

Inhibition of autophagy sensitises cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis

Exposure to higher doses of H_2O_2 (e.g. 100 μM H_2O_2) during 3 h activated apoptosis in HeLa cells (Pallepati et Averill-Bates, 2010). However, it is somewhat controversial whether autophagy acts as a survival or death mechanism and whether it synergises or antagonises with apoptosis, especially after exposure to hydrogen peroxide. The impact of inhibiting autophagy on the induction of apoptosis by H_2O_2 (50 or 100 μM , 3 h) was explored in cells treated with inhibitors of autophagy, Baf, or 3-MA. Activation of apoptosis was first detected using Hoechst 33258, which binds to DNA, allowing detection of highly condensed chromatin corresponding to late-stage apoptosis (Fig. 2.5A). Exposure of cells to 50 and 100 μM H_2O_2 during 3 h increased chromatin condensation. Moreover, caspase-3 activity was enhanced by 25% and 50% after exposure to 50 μM and 100 μM H_2O_2 , respectively (Fig. 2.5B). The inhibition of autophagy by Baf or 3-MA exacerbated these effects, causing a further 10% increase in H_2O_2 -induced chromatin condensation (Fig. 2.5A). This result was confirmed by exacerbation of H_2O_2 -induced caspase-3 activation in Baf or 3-MA treated cells, where caspase-3 activity increased by 40 to 60% (Fig. 2.5B). It should be noted that the inhibitors caused very small effects on basal levels of apoptosis and caspase-3 activity, which support low toxicity of the two inhibitors (Fig. 2.5A, 2.5B). Therefore, inhibition of autophagy by Baf or 3-MA sensitises cells to hydrogen peroxide-induced apoptosis which suggests that autophagy could be a survival response allowing cells to endure stress stimuli.

Inhibition of autophagy partly reverses protection by mild thermotolerance (40°C) against hydrogen peroxide-induced apoptosis

Mild thermotolerance (40°C) has been shown to protect HeLa cells against H_2O_2 -induced apoptosis (Pallepati et Averill-Bates, 2010). This study investigates the ability of preconditioned cells (40°C) to resist apoptosis triggered by H_2O_2 (0-100 μM , 3 h) when autophagy is inhibited (Fig 2.5A and 2.5B). The absence of chromatin

condensation and caspase-3 activation in thermotolerant cells exposed to 50 or 100 μM H_2O_2 for 3 h confirmed that mild thermotolerance (40°C) bestowed resistance to hydrogen peroxide-induced apoptosis (Fig. 2.5A, 2.5B). However, inhibition of autophagy with Baf or 3-MA elicited a significant loss of the protective effect of thermotolerance against H_2O_2 -induced protection (pink versus red bars). This effect could not be attributed to inhibitors-induced toxicity, since Baf and 3-MA alone did not increase chromatin condensation nor caspase-3 activity. Nonetheless, under these conditions, there was still partial protection against apoptosis and caspase-3 activation (pink versus dark blue bars). Inhibition of autophagy using Baf and 3-MA therefore sensitises mild thermotolerant (40°C) cells, as well as non-thermotolerant cells, to H_2O_2 -induced apoptosis. Hence, autophagy could be part of the cellular defence systems activated during preconditioning at 40°C , and which render cells more resistant when exposed to subsequent intense stress.

Inhibition of autophagy sensitises cells to hydrogen peroxide-induced cell death mediated by the three pathways of apoptosis

Activation of apoptosis by hydrogen peroxide involves all of the three main apoptotic pathways mediated by mitochondria, death receptors and the endoplasmic reticulum (ER) (Pallepati et Averill-Bates, 2010; Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b). We therefore assessed which of these apoptotic pathways could be activated by H_2O_2 under conditions where autophagy is inhibited, by activity of caspases that are representative hallmarks of these different pathways.

Mitochondrial and death receptor-mediated apoptosis were monitored using caspase-9 and caspase-8, respectively, as markers (Pallepati et Averill-Bates, 2011b). The exposure of non-thermotolerant cells to H_2O_2 (25 and 50 μM) for 2 h caused increases in activities of caspase-9 (Fig. 2.6A) and caspase-8 (Fig. 2.6B), while preconditioning at 40°C completely protected cells against activation of these two initiator caspases. However, when autophagy was inhibited by Baf or 3-MA, both non-

thermotolerant and thermotolerant (40°C) cells showed 40 to 60% increases in 50 μ M H₂O₂-mediated activation of caspase-9 (Fig. 2.6A) and caspase-8 (Fig 2.6B) activities, compared to their respective controls (same H₂O₂ concentration, without inhibitor). Again, those results cannot be explained by a toxic-effect of the inhibitors since Baf and 3-MA alone did not activate caspases-9 and 8. The results obtained for caspase-9 and caspase-8 were similar to that of caspase-3. Thus, inhibition of autophagy using Baf and 3-MA increased cellular sensitivity to hydrogen peroxide-induced apoptosis, mediated by both the mitochondrial and death receptor pathways. Therefore, autophagy appears to participate in protection afforded by mild thermotolerance (40°C) against mitochondrial- and death receptor-mediated apoptosis.

The activation of the ER pathway of apoptosis by H₂O₂ has been shown to involve activation of calpain, caspase-4 and caspase-7 (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). The consequences of autophagy inhibition on the induction of ER-mediated apoptosis by H₂O₂ were investigated by monitoring these protease markers. In non-thermotolerant cells, H₂O₂ (25 and 50 μ M) caused activation of calpain (Fig. 2.7A), caspase-4 (Fig. 2.7B) and caspase-7 (Fig. 2.8A). Activation of these three proteases was inhibited in thermotolerant (40°C) cells (Fig. 2.7A-B, 2.8A). In non-thermotolerant cells exposed to 50 μ M H₂O₂, inhibitors triggered a 20 to 50% rise in calpain activity (Fig. 2.7A), a 45% augmentation in caspase-4 activity (Fig. 2.7B) and a 20 to 40% increment in caspase-7 activity (Fig. 2.8A). Moreover, Baf and 3-MA alone, did not activate calpain, caspase-4 nor caspase-7 activity. In the context of thermotolerance acquired at 40°C, inhibition of autophagy led to a loss of protection against activation of calpain, caspase-4 and caspase-7, in response to 100 μ M H₂O₂. Under these conditions, these three proteases showed similar responses to caspases-3, -9 and -8. Thus, the inhibition of autophagy triggered enhanced H₂O₂-apoptosis mediated by the ER.

It was previously established that caspase-4 can be activated by either calpain or caspase-7 in the context of ER-mediated apoptosis (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). However, caspase-7 could be activated either by calpain, through the ER-pathway, or either by caspase-9, through the mitochondrial pathway. Therefore, caspase-7 activation in the context of induction of apoptosis by H_2O_2 was examined. Cells were exposed to H_2O_2 (50 μ M) for 2 h, with or without inhibitors of caspase-9 (Z-LEHD-FMK) or calpain (Ac-LLnL-CHO) (Fig. 2.8B). The activation of caspase-7 by 50 μ M H_2O_2 was completely blocked by the calpain inhibitor, whereas the caspase-9 inhibitor had no effect (Fig. 2.8B). The caspase-9 and calpain inhibitors did not affect control cells that were not exposed to H_2O_2 . Therefore, caspase-7 is activated by calpain during H_2O_2 -induced apoptosis through the ER in HeLa cells.

2.2.6 Discussion

This study shows that autophagy is activated transiently in HeLa cells by relatively low doses of hydrogen peroxide (10-90 μ M) after short times of 15 to 30 min. Autophagy was not activated after longer exposure times such as 60 min, nor at higher concentrations of H_2O_2 (≥ 100 μ M). Therefore, autophagy was activated by H_2O_2 in a dose and time-dependent manner. The activation of autophagy was established by increased expression of Beclin-1 and LC3, as well as increased levels of acidic vesicular organelles, which indicate formation of autolysosomes.

Several recent studies have shown that ROS can regulate autophagy (Chen *et al.*, 2009; Scherz-Shouval et Elazar, 2011). Atg4, which can act as both a pro- and anti-autophagy enzyme, is the only autophagy protein that is known to be modified directly by ROS (Scherz-Shouval *et al.*, 2007b). Indeed, H_2O_2 could oxidise a specific cysteine residue located on Atg4, leading to inhibition of this protein. Atg4 is implicated in processing of the bond between LC3 and its conjugated lipid phosphatidylethanolamine, present at the surface of the autophagosome. Therefore,

Atg4 inhibition would prevent dissociation of LC3 from the lipid hence promoting activation of autophagy (Scherz-Shouval *et al.*, 2007b). However, the regulation of Atg4 activity by ROS during autophagy is not well understood (Chen et Klionsky, 2011; Zhang *et al.*, 2015).

ROS were also shown to regulate autophagy by activating 5' AMP-activated protein kinase (AMPK), through its upstream activator ataxia-telangiectasia mutated (ATM) (Alexander *et al.*, 2010). AMPK then activates the downstream tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), which represses mTOR activity and activates autophagy (Kubli et Gustafsson, 2012). ATM can be oxidised and activated directly by oxidative stress (Guo *et al.*, 2010). Another factor implicated in the regulation of autophagy is p53. Indeed, autophagy can be activated by oxidative stress-induced DNA damage, which leads to p53-mediated activation of ATM and repression of mTOR (Feng *et al.*, 2005). Moreover, p53 translocation to the nucleus stimulates the transcription of genes coding for TSC2 and AMPK subunits $\beta 1$ and $\beta 2$ (Maiuri *et al.*, 2010).

Other pathways are also activated by ROS. It was previously shown in HeLa cells that exposure to more severe conditions of H_2O_2 (5-100 μM) for 1 h to 3 h activated multiple pathways of cell death by apoptosis. H_2O_2 activated the Fas death receptor (Pallepati et Averill-Bates, 2011b), mitochondrial (Pallepati et Averill-Bates, 2010) and ER pathways (Pallepati et Averill-Bates, 2011a) of apoptosis. However, exposure to lower doses of H_2O_2 (15-50 μM) for 15 min activated the three ER stress sensor proteins involved in the unfolded protein response (UPR), which is a survival mechanism that protects cells against ER stress-mediated apoptosis (Pallepati et Averill-Bates, 2011a): Protein Kinase RNA-like ER Kinase/eukaryotic Initiation Factor 2 (PERK/eIF2 α), the transcription factor ATF6 and the serine/threonine-Protein Kinase/endoribonuclease/X-Box Binding protein (IRE1/XBP1) (Cao et Kaufman, 2012b). Therefore, lower doses of hydrogen peroxide induce survival responses, whereas higher doses trigger apoptotic cell death. Similar to ER stress, autophagy was

activated by low doses of H_2O_2 in this study and it could be argued that autophagy is also being activated as a protective pathway. As a longer exposure (30-60 min) to low dose hydrogen peroxide (5-90 μM) is an intense stress to cells, autophagy would not be stimulated as a survival response, whereas apoptosis would be activated by those high doses of stress.

This study shows that inhibition of autophagy using two different inhibitors, 3-Methyladenine and bafilomycin-A1, intensifies cellular sensitivity to hydrogen peroxide-induced apoptosis. 3-Methyladenine prevents autophagosome formation and thus is an inhibitor of earlier stages of autophagy (Seglen et Gordon, 1981). However, 3-methyladenine is able to transiently inhibit the complex III PI3K, leading to autophagy inhibition, but it can also suppress the complex I PI3K, thus activating autophagy (Wu *et al.*, 2010). We confirmed that 3-methyladenine did not activate autophagy in our conditions, but rather was acting as an inhibitor. Bafilomycin-A1 is a specific inhibitor of vacuolar-type H^+ -ATPase, preventing lysosomal acidification and therefore suppressing the degradation of autophagosomal contents (Yoshimori *et al.*, 1991). Hence, bafilomycin inhibits autophagy at later stages.

Given that suppression of autophagy with both 3-methyladenine and bafilomycin A1 amplified apoptosis triggered by H_2O_2 , autophagy appears to protect against cell death. Surprisingly, apoptosis was activated through all three of the main pathways of apoptosis, involving mitochondria, death receptors and the ER. Therefore, autophagy could play a key role in survival while facing H_2O_2 -induced stress, notably by degrading oxidised-protein aggregates (Xiong *et al.*, 2007) and ROS-damaged mitochondria (Kim *et al.*, 2007). During more severe conditions of oxidative stress, inhibition of autophagy would be necessary to promote cell death. Accordingly, there is increasing evidence that once apoptosis is activated, several proteins involved in the promotion of autophagy are cleaved or inactivated, leading to autophagy restriction and enhanced apoptosis. For example, interleukin-3 depletion in Ba/F3 cells first induced

autophagy and then apoptosis, and once apoptosis was activated, Beclin-1 and complex III PI3K were cleaved by caspases. Cleaved Beclin-1 was no longer able to induce autophagy, whereas the c-terminal Beclin-1 fragment localised to mitochondria and promoted apoptosis (Wirawan *et al.*, 2010). In addition, the anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X_L, which are key in the regulation of mitochondria-mediated apoptosis, were shown to interact with Beclin-1, preventing its association with the complex III PI3K, leading to suppression of autophagy (Kang *et al.*, 2011). Therefore, the cleavage of Beclin-1 could provide a link from autophagy to the mitochondrial pathway of apoptosis. Moreover, Atg5 can be processed by calpain and the cleavage product induced apoptosis in tumor cells (Yousefi *et al.*, 2006). This effect could be mediated by the binding of cleaved Atg5 to Bcl-X_L and the subsequent release of cytochrome c, or through the interaction of Atg5 with FADD (Pyo *et al.*, 2005). The latter effect could provide a link between autophagy and death receptor pathway of apoptosis. Furthermore, while short (6 h) starvation activated autophagy, longer (16-48 h) starvation induced CHOP-mediated inhibition of autophagy and activation of apoptosis (B'Chir *et al.*, 2014). Likewise, autophagy induction and CHOP under-expression protected fibroblasts against ER-stress induced cell death (Shin *et al.*, 2010), linking autophagy to the ER pathway of apoptosis. Finally, the D form of Atg4 can be cleaved by caspase-3, and the N-terminal fragment then triggers the dissociation of LC3 from its lipid-conjugate, causing a cytotoxic effect (Betin et Lane, 2009). Therefore, it appears that neutralisation of autophagy is necessary to allow apoptotic cell death to occur in response to conditions of severe stress.

This study also shows that mild thermotolerance induced by low dose heat stress at 40°C involved a modest increase in autophagy. Indeed, autophagy was slightly enhanced in thermotolerant (40°C) cells, whether untreated or exposed to H₂O₂. In thermotolerant cells, autophagy induction in response to is then a result of the addition of an activation by mild heat stress and an activation by oxidative stress. Since mild thermotolerance (40°C) was shown to increase cellular generation of ROS (Pallepati et

Averill-Bates, 2010; Zhang et al., 2011), ROS could participate in low dose heat stress (40°C) activation of autophagy. It would be of interest to explore the effects of thermotolerance induction on autophagy regulators such as mTOR, AMPK and p53. Moreover, the involvement of autophagy in the protective effect of mild thermotolerance was highlighted by the increase in H₂O₂-induced apoptotic cell death when autophagy was inhibited in thermotolerant cells. Despite the inhibition of autophagy, mild thermotolerance still provided partial protection against H₂O₂-induced apoptosis. In this context, autophagy appears to intervene in mild thermotolerance, together with other defense mechanisms including heat shock proteins (Hsp), antioxidants and ER stress proteins, to protect cells against oxidative stress.

Other defense molecules that are involved in mild thermotolerance include Hsp72 and 90 (Bettaieb et al., 2005). Possible links between Hsp72 and autophagy have been investigated. Indeed, overexpression of Hsp72 has been associated with enhanced autophagy and decreased apoptosis in a rat model (Li et al., 2011a). Hsp90 also appears to play a role in the regulation of autophagy, because its inhibition triggered suppression of autophagy with subsequent activation of apoptosis. This pathway has been suggested to involve the transcription factor NF- κ B, which would be activated by Hsp90, thus enhancing transcription of the gene coding for Beclin-1 and activation of autophagy (Jiang et al., 2011). Therefore, thermotolerance-induced Hsp activation could be linked to activation of autophagy as a protective pathway and even regulate the switch from autophagy to apoptosis.

Survival pathways involved in the Unfolded Protein Response have been shown to be induced by thermotolerance (Bettaieb et al., 2015; Palapati et al., 2011a). Activated during stress conditions, these pathways inhibit protein translation to reduce the influx of new proteins in the ER, activate the translocation of misfolded or aggregated proteins out of the ER to ensure their proteosomal degradation, and enhance the transcription of genes involved in this protective response. Given that

autophagy is key for the degradation of damaged proteins and organelles, its activation during ER stress could be decisive to ensure cytoprotection. It has been reported in several cell types that autophagy and ER defense systems were regulated in a coordinated or compensatory way (Ryter et Choi, 2013). Autophagy induction has been linked to ER stress by different pathways. Indeed, accumulation of misfolded proteins inside the ER could enhance Atg12 expression, stimulate LC3 I conversion into LC3 II and trigger autophagy in a PERK-eIF2 α -dependent way (Kouroku *et al.*, 2007). However, IRE1 also appears to be essential for the induction of autophagy as a survival response. Indeed, low level ER stress would activate autophagy as a survival response, through an IRE1/c-jun N-terminal kinase (JNK)-dependant pathway (Ogata *et al.*, 2006). Moreover, an increase in cytosolic Ca²⁺ due to ER stress could suppress mTOR through AMPK and therefore activate autophagy (Hoyer-Hansen et Jaattela, 2007). Given that PERK and eIF2 α were upregulated and activated in mild thermotolerant (40°C) cells treated with H₂O₂ (Pallepati et Averill-Bates, 2011a), autophagy induced by H₂O₂ in this context could be activated through this pathway.

2.2.7 Conclusion

This study shows that shorter exposure (15-30 min) to lower doses of hydrogen peroxide (5-75 μ M) activated autophagy, whereas exposure to higher doses of H₂O₂ (50-100 μ M) for longer times (1-3 h) induced apoptosis. The inhibition of autophagy enhanced apoptosis induced by higher doses of H₂O₂, which suggests that in this context, autophagy was acting as a protective mechanism. Mild thermotolerance (40°C), which protects cells against H₂O₂-mediated apoptosis, activated autophagy and was partly impaired when autophagy was inhibited. Once again, this suggests that autophagy plays a protective role in cells. This study improves our understanding of the activation of autophagy and apoptosis by different doses of H₂O₂, and the pathways by which apoptosis occurs when autophagy is compromised. Given that autophagy protects against cell death, it is already under investigation as a target for anti-cancer

treatments (Amaravadi *et al.*, 2011). Because thermotolerance has been shown to activate a large range of defence systems, therapeutic strategies could be developed from this concept to protect against oxidative stress-induced diseases and toxic compounds that generate cellular oxidants.

Figures

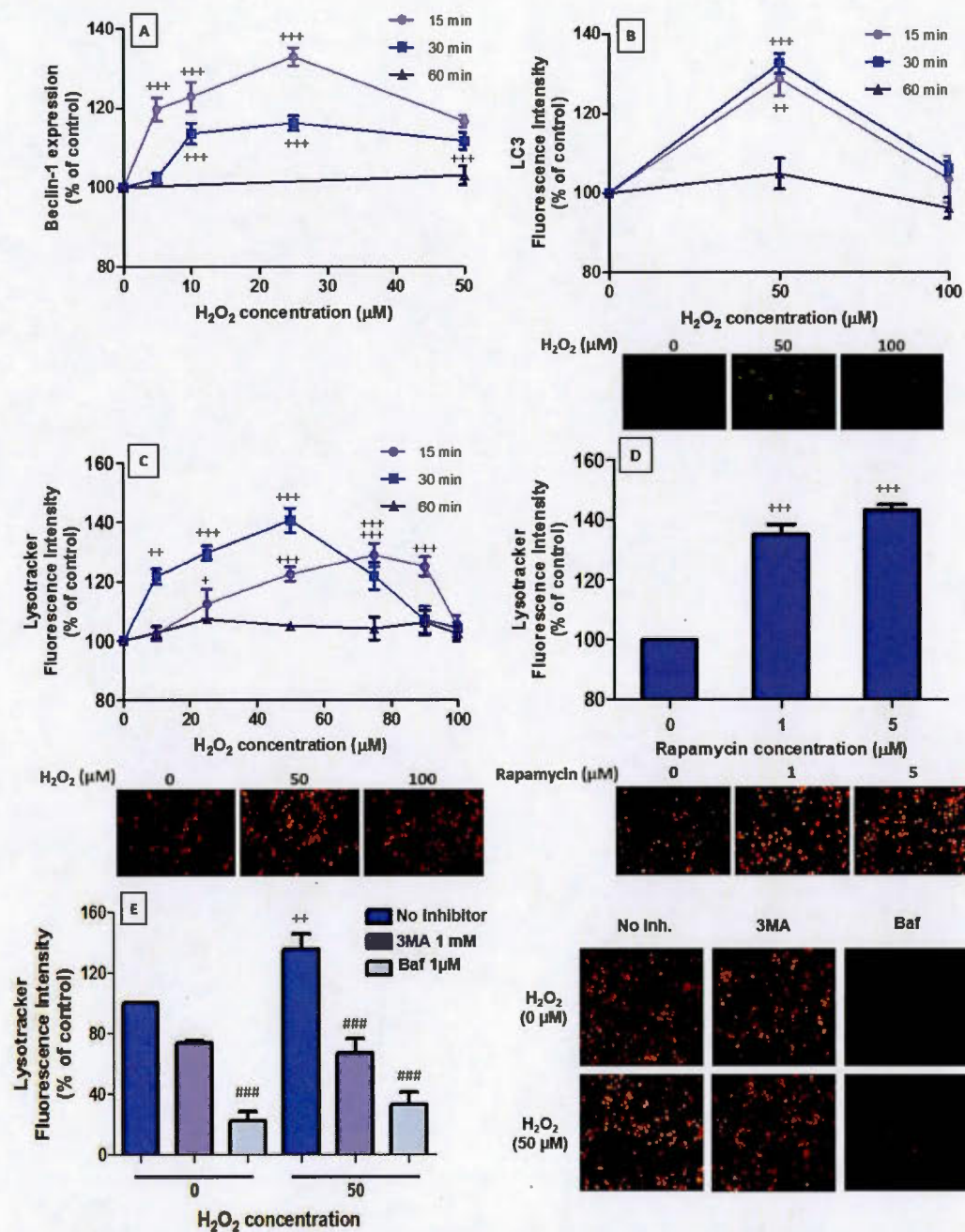


Fig. 2.1 : Low dose oxidative stress transiently activates autophagy

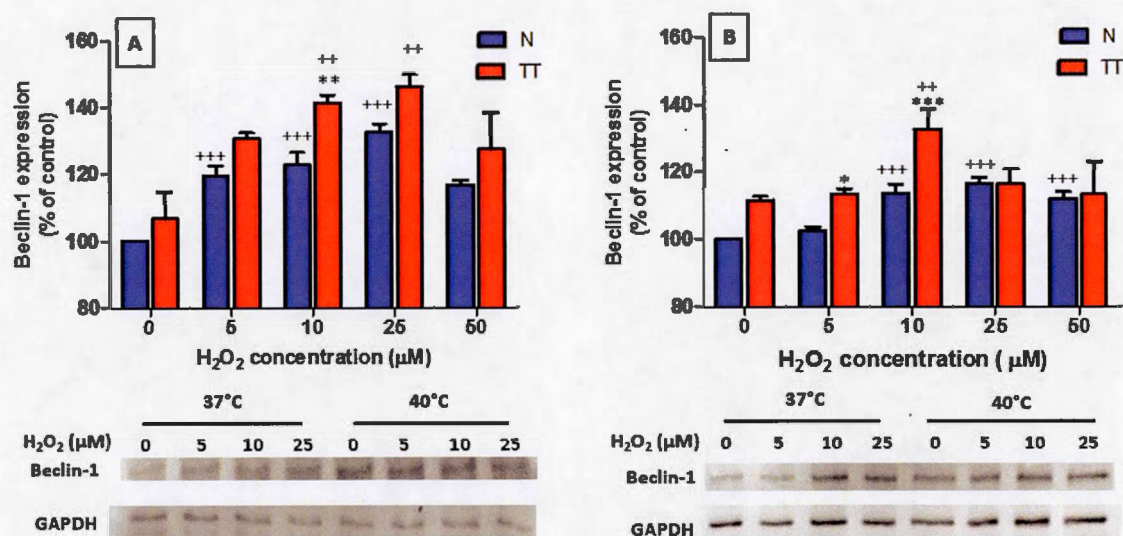


Fig. 2.2 : Low dose oxidative stress enhances Beclin-1 expression in thermotolerant cells

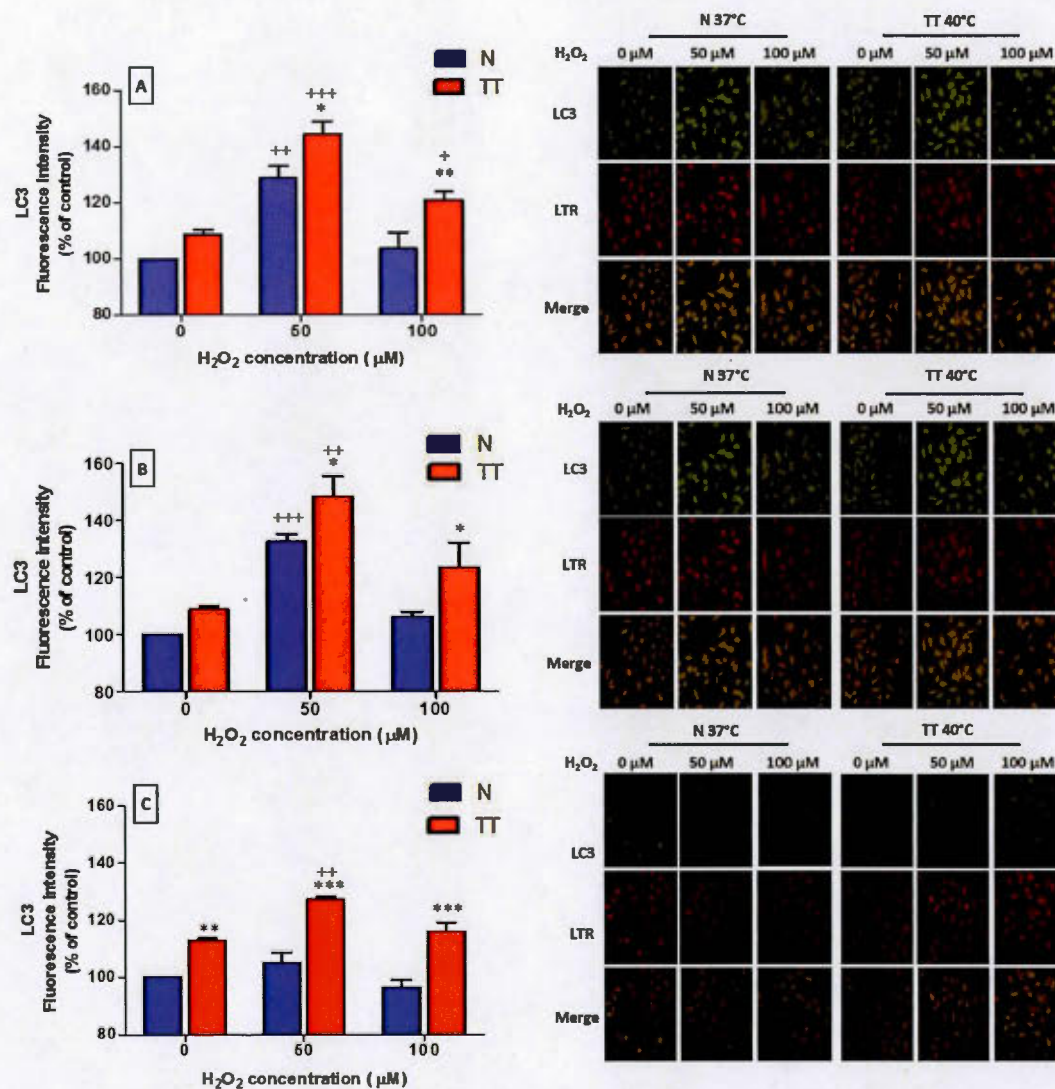


Fig. 2.3 : Low dose oxidative stress enhances LC3 expression in thermotolerant cells.

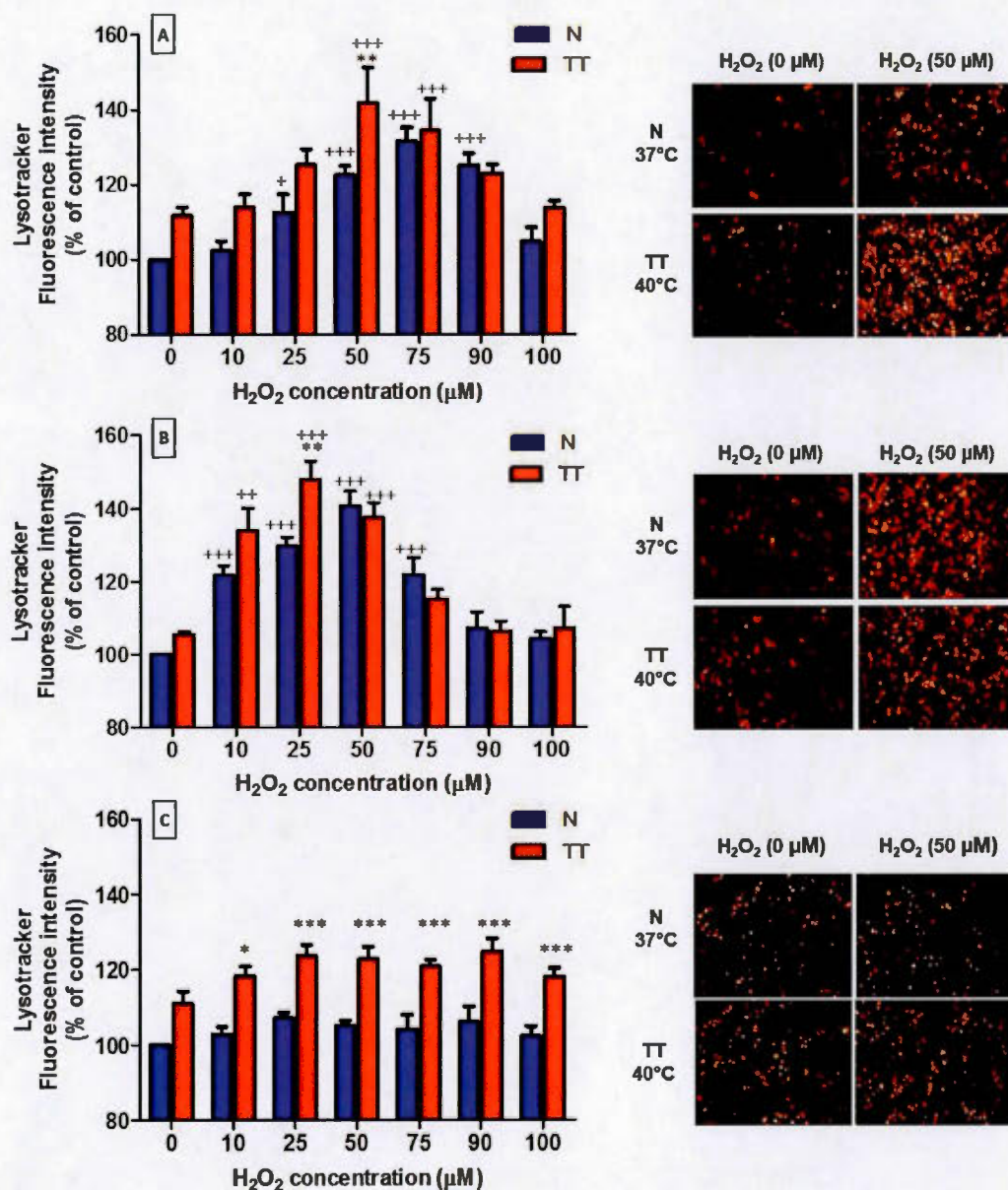


Fig. 2.4 : Low dose oxidative stress enhances formation of acidic vesicular organelles in thermotolerant cells.

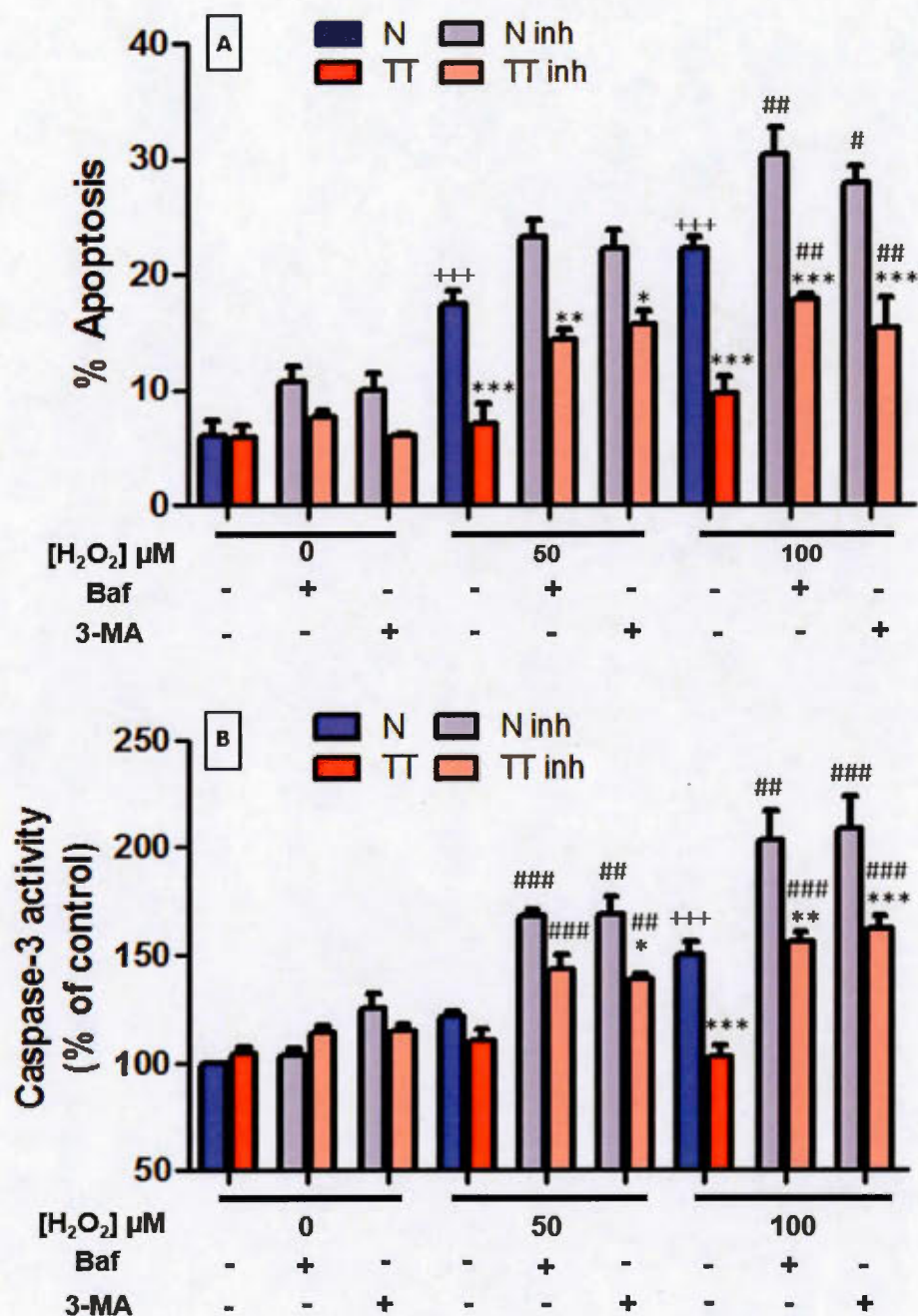


Fig. 2.5 : Inhibition of autophagy increases H₂O₂-mediated chromatin condensation and caspase-3 activation: protection against apoptosis in mildly thermotolerant cells.

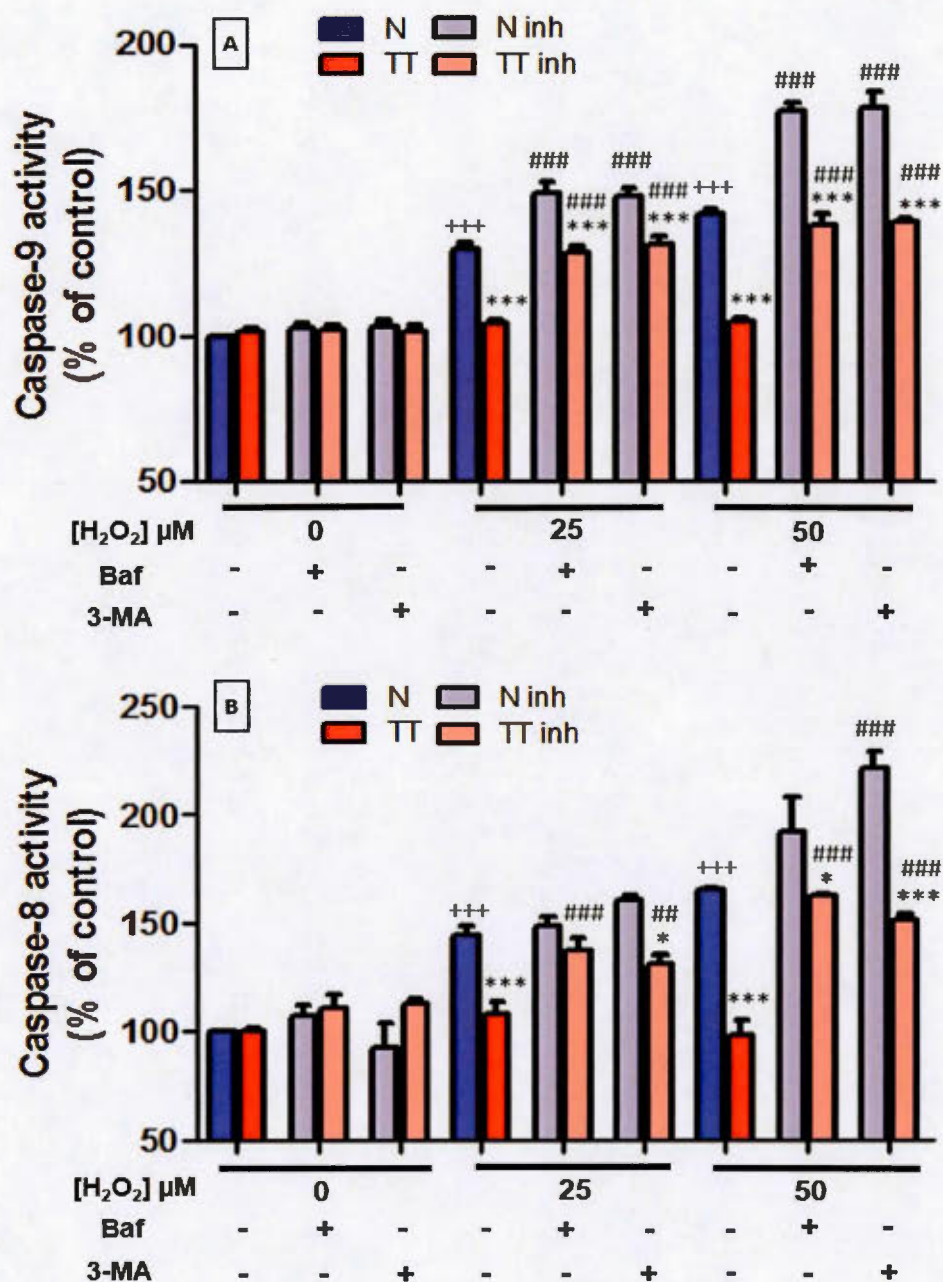


Fig. 2.6 : Inhibition of autophagy increases H₂O₂-mediated caspase-9 and -8 activation: protection by mild thermotolerance against mitochondria and death receptor-mediated apoptosis.

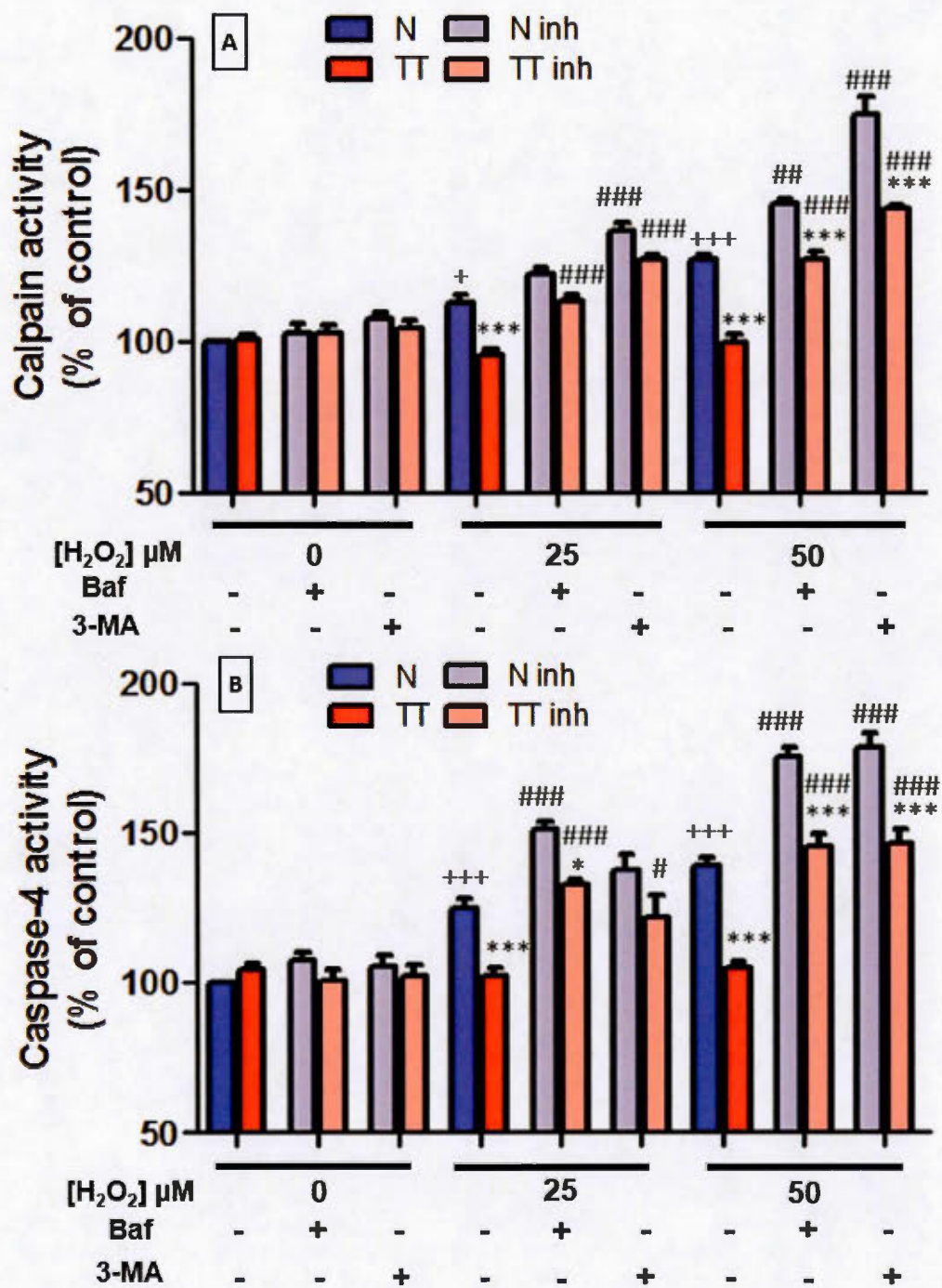


Fig. 2.7 : Inhibition of autophagy increases H₂O₂-mediated calpain and caspase-4 activation: mild thermotolerance protects cells against ER-mediated apoptosis.

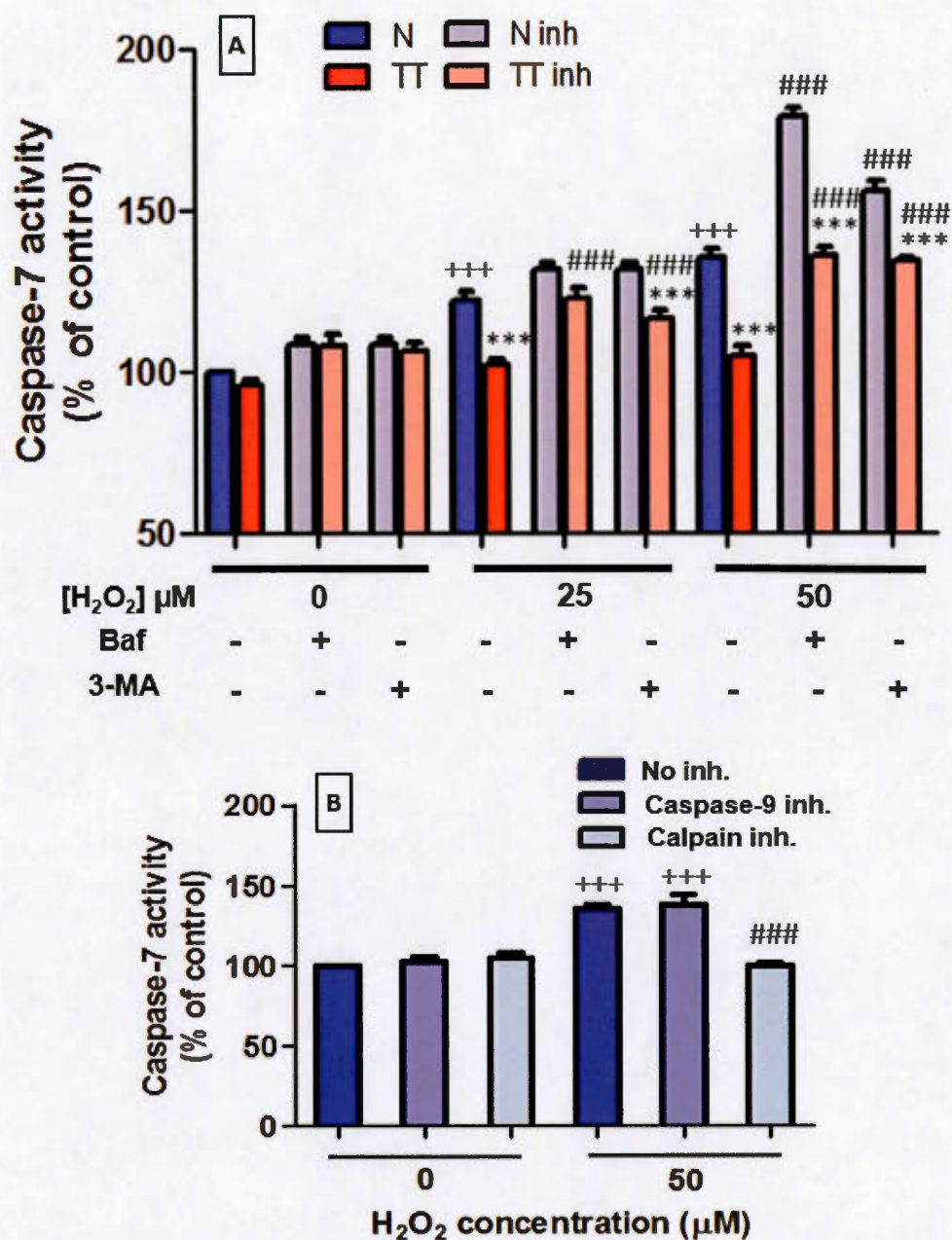


Fig. 2.8 : Inhibition of autophagy increases H₂O₂-mediated caspase-7 activation: mild thermotolerance protects cells against ER-mediated apoptosis.

Figures legends

Fig. 2.1: Low dose oxidative stress transiently activates autophagy

(A) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μM) for 15, 30 or 60 min and monitored for fluorescence of acidic organelles (B) Cells were exposed to rapamycin (1 or 5 μM) for 3 h as a positive control and tracked for acidic organelles (C) Cells were treated with H_2O_2 (0 or 50 μM) for 30 min, with or without bafilomycin A1 (1 μM) or 3-methyladenine (1 mM), and analysed for acidic organelles (D,E) Cells were treated with H_2O_2 (0-50 μM) for 15, 30 or 60 min. (D) Beclin-1 expression was detected in whole cell lysates. (E) LC3 expression was detected by immunofluorescence. (A-E) Control values (0 μM H_2O_2 or 0 μM rapamycin) were normalised to 100%. Data are representative of at least three independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 . $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) or $P < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between inhibitor-free and inhibitor-treated cells at each H_2O_2 concentration.

Fig. 2.2: Low dose oxidative stress enhances Beclin-1 expression in thermotolerant cells

Non thermotolerant (N, 3h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-50 μM) for 15 min (A) or 30 min (B) and tracked for Beclin-1 expression relative to controls (N, 0 μM H_2O_2). Data are representative of a minimum of four independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells at each H_2O_2 concentration.

Fig. 2.3: Low dose oxidative stress enhances LC3 expression in thermotolerant cells

Non thermotolerant (N, 3h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μM) for 15 min (A), 30 min (B) or 60 min (C) and checked for LC3 expression relative to controls (N, 0 μM H_2O_2). Cells were observed using confocal microscopy (original magnification x400). Images are representative of a minimum of three independent experiments. Vertical scale starts at 80. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells at each H_2O_2 concentration.

Fig. 2.4: Low dose oxidative stress enhances formation of acidic vesicular organelles in thermotolerant cells.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μM) for 15 min (A), 30 min (B) or 60 min (C) and tracked for fluorescence of acidic vesicular organelles (original magnification x100), relative to controls (N, 0 μM H_2O_2). Images are representative of a minimum of five independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells at each H_2O_2 concentration.

Fig. 2.5: Inhibition of autophagy increases H_2O_2 -mediated chromatin condensation and caspase-3 activation: protection against apoptosis in mildly thermotolerant cells.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μM) for 3 h, with or without bafilomycin A1 (1 μM) or 3-methyladenine (1 mM). (A) Apoptosis was detected by chromatin condensation (B) Enzymatic activity of caspase-3, expressed relative to control (N, 0 μM H_2O_2). Data represent mean and SEM from at least five independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells at each H_2O_2 concentration. $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) or $P < 0.001$ (###) indicates a statistically significant difference between inhibitor-free and inhibitor-treated cells at each H_2O_2 concentration, for either N or TT cells.

Fig. 2.6: Inhibition of autophagy increases H_2O_2 -mediated caspase-9 and -8 activation: protection by mild thermotolerance against mitochondria and death receptor-mediated apoptosis.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μM) for 2 h (caspase-9) (A) or 1 h (caspase-8) (B), with or without bafilomycin A1 or 3-methyladenine. Cells were analysed for caspase-9 (A) or caspase-8 (B) Activity and expressed relative to controls (N, 0 μM H_2O_2). Data represent mean and SEM from at least six independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N or TT cells at each H_2O_2 concentration. $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) or $P < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between inhibitor-free and inhibitor-treated cells at each H_2O_2 concentration, for either N or TT cells.

Fig. 2.7: Inhibition of autophagy increases H_2O_2 -mediated calpain and caspase-4 activation: mild thermotolerance protects cells against ER-mediated apoptosis.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μ M) for 1 h (calpain) or 2 h (caspase-4), with or without bafilomycin A1 or 3-methyladenine. Enzymatic activity of calpain (A) and caspase-4 (B) were expressed relative to controls (N, 0 μ M H_2O_2). Data represent mean and SEM from at least six independent experiments. Data represent mean and SEM from three independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells at each H_2O_2 concentration. $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) or $P < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between inhibitor-free and inhibitor-treated cells at each H_2O_2 concentration, for either N or TT cells.

Fig. 2.8: Inhibition of autophagy increases H_2O_2 -mediated caspase-7 activation: mild thermotolerance protects cells against ER-mediated apoptosis.

Non-thermotolerant (N, 3 h, 37°C) and thermotolerant (TT, 3 h, 40°C) HeLa cells were treated with H_2O_2 (0-100 μ M) for 2 h, with or without bafilomycin A1 or 3-methyladenine. Enzymatic activity of caspase-7 (A) were expressed relative to controls (N, 0 μ M H_2O_2). Data represent mean and SEM from at least six independent experiments. (B) HeLa cells were pretreated with caspase-9 or calpain inhibitors (20 μ M, 1 h) and then treated with H_2O_2 (0 or 50 μ M) for 2 h before being analysed for caspase-7 activity, and expressed relative to control (no inhibitor, 0 μ M H_2O_2). Data represent mean and SEM from three independent experiments. $P < 0.05$ (+), $P < 0.01$ (++) or $P < 0.001$ (+++) indicate a statistically significant difference between +/- H_2O_2 in N or TT cells. $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***) indicate a statistically significant difference between N and TT cells at each H_2O_2 concentration. $P < 0.05$ (#), $P < 0.01$ (##) or $P < 0.001$ (###) indicate a statistically significant difference between inhibitor-free and inhibitor-treated cells at each H_2O_2 concentration, for either N or TT cells.

CHAPITRE III

CONCLUSION

L'exposition aux constituants néfastes présents dans l'environnement peut représenter une menace pour la santé humaine. En effet, le contact avec les polluants atmosphériques et la fumée de cigarette, entre autres, a été associée avec le développement de maladies respiratoires et cardiovasculaires (Cosselman *et al.*, 2015; Marino *et al.*, 2015). De plus, l'exposition à ces composés ainsi qu'aux métaux lourds, aux pesticides et aux amines hétérocycliques de l'alimentation, a été mise en relation avec le développement de cancers (Hwang et Bowen, 2007; Parron *et al.*, 2014; Schut et Snyderwine, 1999; Tabrez *et al.*, 2014; Taioli, 2008). Afin de protéger la population des effets de ces toxiques, il est important de comprendre les réponses élicitées au niveau cellulaire lors de l'exposition aux stress que ces composés provoquent.

De nombreux toxiques, tels que les radiations ionisantes, la fumée de cigarette, les métaux lourds et divers produits pharmaceutiques génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) au niveau cellulaire, qui pourraient être responsables de leur effet toxique en causant des dégâts oxydatifs au niveau des macromolécules cellulaires (Franco et Panayiotidis, 2009; Jaimes *et al.*, 2004; Leach *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009). Aussi, notre projet vise à comprendre les réponses cellulaires dues à l'exposition à une ERO, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Il a été montré précédemment que le H_2O_2 déclenchait des réponses cellulaires différentes en fonction de l'intensité et du temps d'exposition à cette ERO. En effet, au sein des cellules de carcinome cervical humaines HeLa, de fortes doses de H_2O_2 (100

μM , 1-3h) déclenchent la mort cellulaire par apoptose. Cet effet implique les trois voies principales d'activation de l'apoptose : la voie mitochondriale (Pallepati et Averill-Bates, 2010), la voie des récepteurs de mort (Pallepati et Averill-Bates, 2011b) et la voie du réticulum endoplasmique (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). En revanche, il a été montré que de faibles doses de H_2O_2 (15-50 μM , 15 min) activent des réponses de survie telles que les protéines de défense du réticulum endoplasmique (Pallepati et Averill-Bates, 2011a). Dans notre étude, nous montrons que de faibles doses de H_2O_2 (50 μM , 15-30 min), activent l'autophagie, en étudiant l'expression de Beclin-1 par Western blot, l'expression de LC3 par immunofluorescence et le niveau de lysosome par l'utilisation d'une sonde fluorescente. Il serait pertinent, pour aller plus loin, d'étudier l'expression relative des formes LC3-I et LC3-II, par Western blot, ou en analysant la co-localisation de LC3 avec les lysosomes. Il a été montré, dans un contexte de manque énergétique, que le H_2O_2 généré pouvait oxyder et moduler l'activité de la protéine Atg4, qui est responsable de la dissociation de la protéine LC3 et des lipides présents au niveau de la membrane de l'autophagosome, et qui est donc impliquée dans l'activation de l'autophagie (Scherz-Shouval *et al.*, 2007b). Il serait intéressant d'investiguer si l'oxydation d'Atg4 est également responsable de l'activation de l'autophagie, en réponse à une exposition directe au H_2O_2 .

De plus, nos travaux mettent en évidence le fait que le blocage de l'autophagie par des inhibiteurs chimiques sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le H_2O_2 . L'autophagie induite par de faibles doses de peroxyde d'hydrogène apparaît donc comme un mécanisme de défense cellulaire, qui protège les cellules contre l'apoptose induite par le stress oxydatif. Les inhibiteurs utilisés sont la 3-méthyladénine, qui bloque le complexe PI3K III impliqué dans l'initiation de l'autophagie et la bafilomycine A1, qui perturbe le fonctionnement des pompes à proton ATPasiques vacuolaires et empêche la dégradation du contenu vésiculaire au niveau des phases tardives de l'autophagie. Il est à noter que la 3-méthyladénine est capable d'activer l'autophagie en inhibant les complexes PI3K de classe I, lors d'une exposition longue

à l'inhibiteur (>6h) et dans des conditions de grande disponibilité en nutriments (Wu *et al.*, 2010). De plus, la bafilomycine A1, en inhibant les pompes à proton ATPasiques vacuolaires, affecte tous les processus de dégradation lysosomale, et pas seulement l'autophagie (Yoshimori *et al.*, 1991). Cependant, bien que ces deux inhibiteurs ne présentent pas une très grande spécificité pour les processus autophagiques, ils affectent l'induction de l'apoptose par le H₂O₂ dans notre étude de manière très semblable. Il pourrait être intéressant d'utiliser un autre type d'inhibiteur, tel qu'un siRNA ciblant une protéine de la famille Atg, afin de déterminer si l'inhibition de l'autophagie par ce moyen sensibiliserait également les cellules à l'apoptose induite par le H₂O₂. Cependant cette approche présente également des limites puisque le ciblage de transcrits par un siRNA n'entraîne pas nécessairement une modulation de l'expression de la protéine associée, et l'inhibition peut ne pas être efficace. De plus, certaines protéines Atg étant capables de participer dans différentes voies de signalisation, leur inhibition pourrait avoir d'autres effets indésirables pour le fonctionnement cellulaire.

Certains mécanismes capables de protéger les cellules contre la mort induite par les stress sont d'intérêt pour le développement de stratégies de protection des êtres vivants et d'autres espèces envers les effets néfastes des toxiques environnementaux. Ainsi, l'induction de la thermotolérance par un stress thermique modéré (40°C, 3h) est une réponse adaptatrice de survie qui rend les cellules d'avantage résistantes lors de leur exposition à un stress ultérieur, tel que le stress thermique ou oxydatif (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Pallepati et Averill-Bates, 2010). Il a été montré que la thermotolérance (40°C) protégeait les cellules HeLa contre l'apoptose induite par le H₂O₂, et ce par les trois voies de déclenchement principales de l'apoptose (Pallepati et Averill-Bates, 2010; Pallepati et Averill-Bates, 2011a, 2011b). Il a par ailleurs été démontré que les effets protecteurs de la thermotolérance (40°C) impliquent l'induction de protéines de choc thermique comme Hsp27, 32, 60 72, 90 et 110 (Bettaieb et Averill-Bates, 2005, 2008), de défenses antioxydantes comme les

catalases, MnSOD et GSH (Pallepati et Averill-Bates, 2010), de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-X_L (Glory *et al.*, 2014) et de protéines de défense du RE comme (p)PERK, (p)eIF2 α , Bip et ATF6 (Bettaieb et Averill-Bates, 2015; Pallepati et Averill-Bates, 2011a).

Nos travaux montrent que l'autophagie est induite par un stress thermique modéré (40°C, 3h). De plus, nous démontrons que l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine ou la bafilomycine diminue partiellement l'effet protecteur de la thermotolérance (40°C). Aussi, l'effet protecteur de la thermotolérance pourrait impliquer l'activation de l'autophagie comme réponse de survie. Étant donné qu'il a été montré que le niveau cellulaire d'ERO augmentait lorsque les cellules étaient exposées à un stress thermique modéré (40°C, 3h) (Pallepati et Averill-Bates, 2010), il serait intéressant d'étudier si cette augmentation est à l'origine de l'activation de l'autophagie observée dans notre étude. Par ailleurs, il a été mis en évidence que les Hsp27, 72 et 90, pouvaient activer l'autophagie (Jiang *et al.*, 2011; Kumano *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2011a). Ces protéines étant surexprimées dans le cadre de la thermotolérance (40°C) (Bettaieb et Averill-Bates, 2005), il serait pertinent de déterminer si elles sont impliquées dans l'augmentation de l'autophagie induite par la thermotolérance. De même, l'activation de la voie de défense du RE PERK/eIF2 α lors de l'acquisition de la thermotolérance (Pallepati et Averill-Bates, 2011a) pourrait participer à l'activation de l'autophagie dans ce contexte, comme cela a été démontré dans le cas d'un stress causé par l'accumulation de protéines mal repliées (Kouroku *et al.*, 2007). Enfin, la protéine anti-apoptotique Bcl-2, du fait de son implication dans la régulation de l'activité de Beclin-1 (Kang *et al.*, 2011), et donc du complexe PI3K III, et du fait de sa surexpression dans le contexte de la thermotolérance (40°C) (Glory *et al.*, 2014), pourrait jouer un rôle dans l'activation de l'autophagie. Ces voies sont autant de pistes d'investigation pour déterminer le mécanisme d'induction de l'autophagie lors de l'acquisition de la thermotolérance.

Par ailleurs, des études mettent en avant le fait que l'autophagie et l'apoptose sont régulées de façon croisée, faisant intervenir des protéines communes. Notamment, des protéines telles qu'Atg5 (Yousefi *et al.*, 2006), Atg4 D (Betin et Lane, 2009) et Beclin-1 (Wirawan *et al.*, 2010) peuvent être clivées par les caspases en réponse à des stress traduisant une déplétion énergétique, conduisant à l'arrêt de l'autophagie et à l'induction de l'apoptose. Il serait intéressant de déterminer si ces protéines sont clivées en réponse à une forte dose de H_2O_2 et, le cas échéant, de suivre les cinétiques de clivage de ces protéines en réponse au peroxyde d'hydrogène, au sein de cellules thermotolérantes ou non, afin d'identifier plus précisément les conditions de stress régulant le passage de l'activation de l'autophagie à celle de l'apoptose.

Ces travaux permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse des cellules de carcinome cervical humain au stress oxydatif, et donc à de nombreux stress environnementaux. Afin de déterminer si ces observations sont spécifiques au type cellulaire étudié ou généralisables aux cellules humaines, il serait pertinent de poursuivre ces travaux en utilisant d'autres types cellulaires et/ou des cellules primaires. L'importance de la dose de stress dans le type de réponse élicitée ainsi que la capacité de la thermotolérance induite à 40°C à activer des mécanismes de défense sont intéressants pour le développement de stratégies de protection des Hommes contre les effets délétères des stress (Fig.3.1).

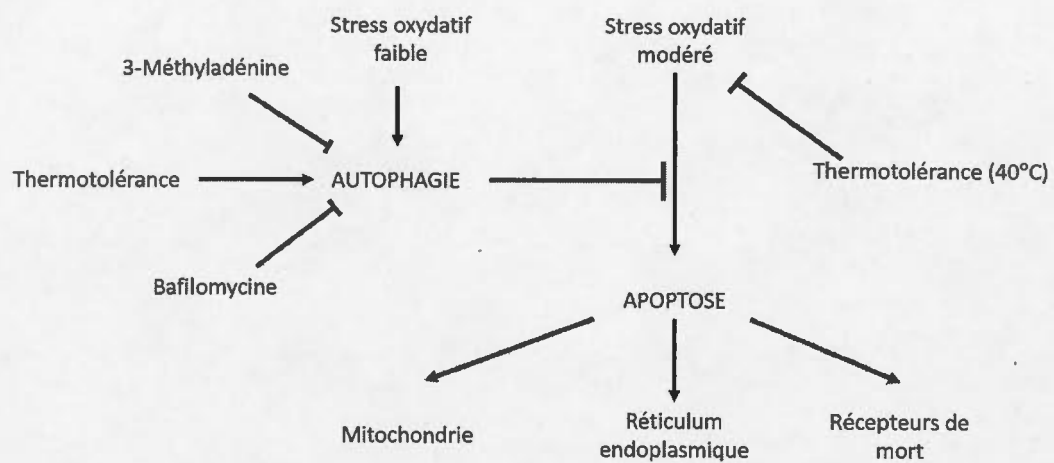


Fig. 3.1 : Schéma bilan

RÉFÉRENCES

- Alexander, A., Cai, S.L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.L., Shen, J., Person, M.D., Kusewitt, D., Mills, G.B., Kastan, M.B. et Walker, C.L. (2010). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(9), 4153-4158.
- Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T. et White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res*, 17(4), 654-666.
- Azad, M.B., Chen, Y. et Gibson, S.B. (2009). Regulation of autophagy by reactive oxygen species (ROS): implications for cancer progression and treatment. *Antioxid Redox Signal*, 11(4), 777-790.
- B'Chir, W., Chaveroux, C., Carraro, V., Averous, J., Maurin, A.C., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Fafournoux, P. et Bruhat, A. (2014). Dual role for CHOP in the crosstalk between autophagy and apoptosis to determine cell fate in response to amino acid deprivation. *Cell Signal*, 26(7), 1385-1391.
- Bae, Y.S., Oh, H., Rhee, S.G. et Yoo, Y.D. (2011). Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Mol Cells*, 32(6), 491-509.
- Barrera, G. (2012). Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol*, 12, 1-21.
- Bedard, K. et Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M. et Green, D.R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, 2(8), 469-475.
- Bernardi, P. (2013). The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol*, 4(95), 3377-3389.
- Betin, V.M. et Lane, J.D. (2009). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J Cell Sci*, 122(14), 2554-2566.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2005). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis. *J Cell Physiol*, 205(1), 47-57.

- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2008). Thermotolerance induced at a fever temperature of 40°C protects cells against hyperthermia-induced apoptosis mediated by death receptor signalling. *Biochem Cell Biol*, 86(6), 521-538.
- Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2015). Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C alleviates heat shock-induced ER stress and apoptosis in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*, 1853(1), 52-62.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen, C., Erzurum, S. et Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 5(1), 9-19.
- Bouchier-Hayes, L. et Green, D.R. (2012). Caspase-2: the orphan caspase. *Cell Death Differ*, 19(1), 51-57.
- Bowman, E.J., Siebers, A. et Altendorf, K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21), 7972-7976.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M. et Shore, G.C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22(53), 8608-8618.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F.J., Jr. et Krause, K.H. (2012). Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 142, 13659-13664.
- Cao, S.S. et Kaufman, R.J. (2012a). Unfolded protein response. *Curr Biol*, 22(16), 622-626.
- Chen, Y., Azad, M.B. et Gibson, S.B. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell Death Differ*, 16(7), 1040-1052.
- Chen, Y. et Gibson, S.B. (2008). Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy*, 4(2), 246-248.
- Chen, Y. et Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*, 124(2), 161-170.
- Circu, M.L. et Aw, T.Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 48(6), 749-762.
- Codogno, P. et Meijer, A.J. (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12(2), 1509-1518.
- Cosselman, K.E., Navas-Acien, A. et Kaufman, J.D. (2015). Environmental factors in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 12(11), 627-642.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. et Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(1), 49-63.
- D'Autreaux, B. et Toledano, M.B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), 813-824.
- Davies, M.J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*, 1703(2), 93-109.
- Deavall, D.G., Martin, E.A., Horner, J.M. et Roberts, R. (2012). Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol*, 12, 1-13.

- Dickinson, B.C. et Chang, C.J. (2011). Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol*, 7(8), 504-511.
- Dorstyn, L., Puccini, J., Wilson, C.H., Shalini, S., Nicola, M., Moore, S. et Kumar, S. (2012). Caspase-2 deficiency promotes aberrant DNA-damage response and genetic instability. *Cell Death Differ*, 19(8), 1288-1298.
- Edinger, A.L. et Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*, 16(6), 663-669.
- Feng, Z., Zhang, H., Levine, A.J. et Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(23), 8204-8209.
- Franco, R. et Panayiotidis, M.I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress, human disease and the "black box" of their synergism: how much have we revealed? *Mutat Res*, 674(1), 1-2.
- Franco, R., Sanchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E.M. et Panayiotidis, M.I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: menage a trois. *Mutat Res*, 674(1), 3-22.
- Fujita, E., Kuroku, Y., Jimbo, A., Isoai, A., Maruyama, K. et Momoi, T. (2002). Caspase-12 processing and fragment translocation into nuclei of tunicamycin-treated cells. *Cell Death Differ*, 9(10), 1108-1114.
- Fulda, S. (2012). Autophagy and cell death. *Autophagy*, 8(8), 1250-1251.
- Fulda, S., Gorman, A.M., Hori, O. et Samali, A. (2010). Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol*, 10, 1-23.
- Glick, D., Barth, S. et Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 221(1), 3-12.
- Glory, A., Bettaieb, A. et Averill-Bates, D.A. (2014). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects cells against hyperthermia-induced pro-apoptotic changes in Bcl-2 family proteins. *Int J Hyperth*, 30(7), 502-512.
- Gozuacik, D. et Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), 2891-2906.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T. et Alnemri, E.S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem*, 277(16), 13430-13437.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D. et Paull, T.T. (2010). ATM activation by oxidative stress. *Sci*, 330(6003), 517-521.
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301(1), 5-17.
- Halestrap, A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol*, 46(6), 821-831.
- He, C. et Levine, B. (2010). The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 140-149.
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(2), 89-102.
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. et Tohyama, M.

- (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*, 165(3), 347-356.
- Hock, A.K. et Vousden, K.H. (2014). The role of ubiquitin modification in the regulation of p53. *Biochim Biophys Acta*, 1843(1), 137-149.
- Holoch, P.A. et Griffith, T.S. (2009). TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies. *Eur J Pharmacol*, 625(1), 63-72.
- Hoyer-Hansen, M. et Jaattela, M. (2007). Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*, 14(9), 1576-1582.
- Hu, W., Feng, Z. et Levine, A.J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes Cancer*, 3(3), 199-208.
- Huttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T.H., Kagan, V.E., Samavati, L., Doan, J.W. et Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, 11(3), 369-381.
- Hwang, E.S. et Bowen, P.E. (2007). DNA damage, a biomarker of carcinogenesis: its measurement and modulation by diet and environment. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 47(1), 27-50.
- Jaimes, E.A., DeMaster, E.G., Tian, R.X. et Raij, L. (2004). Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(6), 1031-1036.
- Jiang, Q., Wang, Y., Li, T., Shi, K., Li, Z., Ma, Y., Li, F., Luo, H., Yang, Y. et Xu, C. (2011). Heat shock protein 90-mediated inactivation of nuclear factor-kappaB switches autophagy to apoptosis through becn1 transcriptional inhibition in selenite-induced NB4 cells. *Mol Biol Cell*, 22(8), 1167-1180.
- Joseph, P. (2009). Mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 272-279.
- Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M. et Kim, D.H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584(7), 1287-1295.
- Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. et Tang, D. (2011). The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*, 18(4), 571-580.
- Kantari, C. et Walczak, H. (2011). Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1813(4), 558-563.
- Kaushik, S., Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kiffin, R., Martinez-Vicente, M., Kon, M., Orenstein, S.J., Wong, E. et Cuervo, A.M. (2011). Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J Cell Sci*, 124(4), 495-499.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M. et Harmon, B.V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73(8), 2013-2026.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. et Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys*, 462(2), 245-253.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. et Hocevar, B.A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol*, 38(1), 96-109.

- Klionsky, D.J., Codogno, P., Cuervo, A.M., Deretic, V., Elazar, Z., Fueyo-Margareto, J., Gewirtz, D.A., Kroemer, G., Levine, B., Mizushima, N., Rubinsztein, D.C., Thumm, M. et Tooze, S.A. (2010). A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes. *Autophagy*, 6(4), 438-448.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E. et Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*, 14(2), 230-239.
- Kregel, K.C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, 92(5), 2177-2186.
- Kroemer, G., Marino, G. et Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40(2), 280-293.
- Kryston, T.B., Georgiev, A.B., Pissis, P. et Georgakilas, A.G. (2011). Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*, 711(1), 193-201.
- Kubli, D.A. et Gustafsson, A.B. (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*, 111(9), 1208-1221.
- Kumano, M., Furukawa, J., Shiota, M., Zardan, A., Zhang, F., Beraldi, E., Wiedmann, R.M., Fazli, L., Zoubeidi, A. et Gleave, M.E. (2012). Cotargeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 11(8), 1661-1671.
- Landry, J., Bernier, D., Chretien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M. et Marceau, N. (1982). Synthesis and degradation of heat shock proteins during development and decay of thermotolerance. *Cancer Res*, 42(6), 2457-2461.
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R. et Mikkelsen, R.B. (2001). Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res*, 61(10), 3894-3901.
- Lee, J., Giordano, S. et Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J*, 441(2), 523-540.
- Leibowitz, B. et Yu, J. (2010). Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biol Ther*, 9(6), 417-422.
- Lemasters, J.J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res*, 8(1), 3-5.
- Levine, B. et Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27-42.
- Levine, B. et Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 115(10), 2679-2688.
- Li, S., Zhou, Y., Fan, J., Cao, S., Cao, T., Huang, F., Zhuang, S., Wang, Y., Yu, X. et Mao, H. (2011a). Heat shock protein 72 enhances autophagy as a protective mechanism in lipopolysaccharide-induced peritonitis in rats. *Am J Pathol*, 179(6), 2822-2834.

- Li, W.W., Li, J. et Bao, J.K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*, 69(7), 1125-1136.
- Li, Z.Y., Yang, Y., Ming, M. et Liu, B. (2011b). Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 414(1), 5-8.
- Limon-Pacheco, J. et Gonsebatt, M.E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res*, 674(1-2), 137-147.
- Liu, J., Qu, W. et Kadiiska, M.B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3), 209-214.
- Ly, J.D., Grubb, D.R. et Lawen, A. (2003). The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8(2), 115-128.
- Mahmood, Z. et Shukla, Y. (2010). Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp Cell Res*, 316(6), 887-899.
- Maillet, A. et Pervaiz, S. (2012). Redox regulation of p53, redox effectors regulated by p53: a subtle balance. *Antioxid Redox Signal*, 16(11), 1285-1294.
- Maiuri, M.C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S.A. et Kroemer, G. (2010). Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 181-185.
- Malhotra, J.D. et Kaufman, R.J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 18(6), 716-731.
- Marino, E., Caruso, M., Campagna, D. et Polosa, R. (2015). Impact of air quality on lung health: myth or reality? *Ther Adv Chronic Dis*, 6(5), 286-298.
- Marino, G., Madeo, F. et Kroemer, G. (2011). Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol*, 23(2), 198-206.
- Martindale, J.L. et Holbrook, N.J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, 192(1), 1-15.
- Martinou, J.C. et Youle, R.J. (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell*, 21(1), 92-101.
- Mayer, B. et Oberbauer, R. (2003). Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci*, 18, 89-94.
- Mena, S., Ortega, A. et Estrela, J.M. (2009). Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis. *Mutat Res*, 674(1), 36-44.
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 22(2), 132-139.
- Momoi, T. (2004). Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat*, 28(1), 101-105.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13.
- Nakagawa, T. et Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, 150(4), 887-894.
- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., Shiosaka, S., Hammarback, J.A.,

- Urano, F. et Imaizumi, K. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol*, 26(24), 9220-9231.
- Ola, M.S., Nawaz, M. et Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Mol Cell Biochem*, 351(1), 41-58.
- Olsson, M., Vakifahmetoglu, H., Abruzzo, P.M., Hogstrand, K., Grandien, A. et Zhivotovsky, B. (2009). DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 28(18), 1949-1959.
- Olsson, M. et Zhivotovsky, B. (2011). Caspases and cancer. *Cell Death Differ*, 18(9), 1441-1449.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S. et Zhivotovsky, B. (2007a). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 12(5), 913-922.
- Ott, M., Zhivotovsky, B. et Orrenius, S. (2007b). Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*, 14(7), 1243-1247.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D. (2010). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53. *Arch Biochem Biophys*, 495(2), 97-111.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2011a). Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40 degrees C. *Biochim Biophys Acta*, 1813(12), 1987-1999.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2011b). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*, 50(6), 667-679.
- Pallepati, P. et Averill-Bates, D.A. (2012). Reactive Oxygen Species, Cell Death Signaling and Apoptosis. Dans Pantopoulos, K. et H. Schipper (dir.), *Princ Free Rad Biomed* (Vol. 2, p. 513-546). Montreal, QC : Nova Science Publishers, Inc.
- Parron, T., Requena, M., Hernandez, A.F. et Alarcon, R. (2014). Environmental exposure to pesticides and cancer risk in multiple human organ systems. *Toxicol Lett*, 230(2), 157-165.
- Pennarun, B., Meijer, A., de Vries, E.G., Kleibeuker, J.H., Kruij, F. et de Jong, S. (2010). Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1805(2), 123-140.
- Pirkkala, L., Nykanen, P. et Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J*, 15(7), 1118-1131.
- Pisoschi, A.M. et Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97, 55-74.
- Pizzo, P. et Pozzan, T. (2007). Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol*, 17(10), 511-517.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. et Greenwood, M.T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta*, 1813(1), 238-259.

- Prindull, G. (1995). Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer*, 31(1), 116-123.
- Przybytkowski, E., Bates, J.H., Bates, D.A. et Mackillop, W.J. (1986). Thermal adaptation in CHO cells at 40 degrees C: the influence of growth conditions and the role of heat shock proteins. *Radiat Res*, 107(3), 317-331.
- Pyo, J.O., Jang, M.H., Kwon, Y.K., Lee, H.J., Jun, J.I., Woo, H.N., Cho, D.H., Choi, B., Lee, H., Kim, J.H., Mizushima, N., Oshumi, Y. et Jung, Y.K. (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*, 280(21), 20722-20729.
- Rao, R.V., Hermel, E., Castro-Obregon, S., del Rio, G., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M. et Bredesen, D.E. (2001). Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, 276(36), 33869-33874.
- Rasheva, V.I. et Domingos, P.M. (2009). Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis*, 14(8), 996-1007.
- Ravikumar, B., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J. et Rubinshtein, D.C. (2006). Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis. *Hum Mol Genet*, 15(7), 1209-1216.
- Ravikumar, B., Futter, M., Jahreiss, L., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Narayanan, U., Renna, M., Jimenez-Sanchez, M., Sarkar, S., Underwood, B., Winslow, A. et Rubinshtein, D.C. (2009). Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci*, 122(11), 1707-1711.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., Massey, D.C., Menzies, F.M., Moreau, K., Narayanan, U., Renna, M., Siddiqi, F.H., Underwood, B.R., Winslow, A.R. et Rubinshtein, D.C. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 90(4), 1383-1435.
- Riedl, S.J. et Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(11), 897-907.
- Ryter, S.W. et Choi, A.M. (2013). Autophagy: An Integral Component of the Mammalian Stress Response. *J Biochem Pharmacol Res*, 1(3), 176-188.
- Salvesen, G.S. et Riedl, S.J. (2008). Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 615, 13-23.
- Samali, A., Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S. et Orrenius, S. (1999). Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ*, 6(6), 495-496.
- Scherz-Shouval, R. et Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*, 17(9), 422-427.
- Scherz-Shouval, R. et Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*, 36(1), 30-38.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E. et Elazar, Z. (2007a). Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. *Autophagy*, 3(4), 371-373.

- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. et Elazar, Z. (2007b). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*, 26(7), 1749-1760.
- Schroder, M. et Kaufman, R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-789.
- Schut, H.A. et Snyderwine, E.G. (1999). DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20(3), 353-368.
- Seglen, P.O. et Gordon, P.B. (1981). Vanadate inhibits protein degradation in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 256(15), 7699-7701.
- Shen, H.M. et Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy*, 7(5), 457-465.
- Shen, S., Kepp, O. et Kroemer, G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy*, 8(1), 1-3.
- Shin, Y.J., Han, S.H., Kim, D.S., Lee, G.H., Yoo, W.H., Kang, Y.M., Choi, J.Y., Lee, Y.C., Park, S.J., Jeong, S.K., Kim, H.T., Chae, S.W., Jeong, H.J., Kim, H.R. et Chae, H.J. (2010). Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress. *Arthritis Res Ther*, 12(1), 7-19.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 82(2), 291-295.
- Stephenson, F.A. (2010). Activity-dependent immobilization of mitochondria: the role of miro. *Front Mol Neurosci*, 3(9), 541-553.
- Szegedzi, E., Fitzgerald, U. et Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 186-194.
- Tabas, I. et Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*, 13(3), 184-190.
- Tabrez, S., Priyadarshini, M., Priyamvada, S., Khan, M.S., Na, A. et Zaidi, S.K. (2014). Gene-environment interactions in heavy metal and pesticide carcinogenesis. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 760, 1-9.
- Taioli, E. (2008). Gene-environment interaction in tobacco-related cancers. *Carcinogenesis*, 29(8), 1467-1474.
- Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S. et Greer, P.A. (2006). Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 281(23), 16016-16024.
- Tanida, I. (2011). Autophagy basics. *Microbiol Immunol*, 55(1), 1-11.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203), 1456-1462.
- Thoreen, C.C. et Sabatini, D.M. (2009). Rapamycin inhibits mTORC1, but not completely. *Autophagy*, 5(5), 725-726.
- Toyokuni, S. (2009). Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci*, 100(1), 9-16.

- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P. et Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuroparmacol*, 7(1), 65-74.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H. et Zhivotovsky, B. (2010). The unpredictable caspase-2: what can it do? *Trends Cell Biol*, 20(3), 150-159.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. et Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1), 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. et Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1), 1-40.
- Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T. et Vandenabeele, P. (2012). Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ*, 19(1), 75-86.
- Walter, P. et Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. et Baldwin, A.S., Jr. (1998). NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281(5383), 1680-1683.
- Weinlich, R., Dillon, C.P. et Green, D.R. (2011). Ripped to death. *Trends Cell Biol*, 21(11), 630-637.
- West, J.D. et Marnett, L.J. (2006). Endogenous reactive intermediates as modulators of cell signaling and cell death. *Chem Res Toxicol*, 19(2), 173-194.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., Agostinis, P., Vanden Berghe, T., Lippens, S. et Vandenabeele, P. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death Dis*, 1, 1-18.
- Wu, Y.T., Tan, H.L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.N., Codogno, P. et Shen, H.M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem*, 285(14), 10850-10861.
- Wurstle, M.L., Laussmann, M.A. et Rehm, M. (2012). The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res*, 318(11), 1213-1220.
- Wyllie, A.H. (2010). "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*, 42(1), 4-9.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q. et Bassham, D.C. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 143(1), 291-299.
- Yakes, F.M. et Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(2), 514-519.

- Yamamuro, A., Kishino, T., Ohshima, Y., Yoshioka, Y., Kimura, T., Kasai, A. et Maeda, S. (2011). Caspase-4 directly activates caspase-9 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Sci*, 115(2), 239-243.
- Yoshida, K. et Miki, Y. (2010). The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage. *Cancer Sci*, 101(4), 831-835.
- Yoshimori, T., Yamamoto, A., Moriyama, Y., Futai, M. et Tashiro, Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem*, 266(26), 17707-17712.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. et Simon, H.U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, 8(10), 1124-1132.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H. et Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(13), 4952-4957.
- Zhang, L., Wang, K., Lei, Y., Li, Q., Nice, E.C. et Huang, C. (2015). Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic Biol Med*, 89, 452-465.
- Zhang, Y. et Calderwood, S.K. (2011). Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review. *Int J Hyperth*, 27(5), 409-414.
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A.G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A. et Panayiotidis, M.I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development. *Chem Biol Interact*, 188(2), 334-339.